demia di Medicina di Torino

del Gem. Moretto

XXVIII. E 1

Pietro Monetti

I
MICROPARASSITI
NELLE
MALATTIE DA INFEZIONE

BIBLIOTECA MEDICA CONTEMPORANEA

BORDONI - UFFREDUZZI
Professore nella Regia Università di Torino

I MICROPARASSITI

NELLE

MALATTIE DA INFEZIONE

MANUALE TECNICO
DI
BATTERIOLOGIA

Seconda Edizione
completamente rifusa ed accresciuta

Illustrato da 48 incisioni intercalate nel testo
e da 8 tavole cromolitografiche

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

CASA EDITRICE
DOTT. FRANCESCO VALLARDI
Corso Magenta, 48. — MILANO — Corso Magenta, 48.
NAPOLI S. Anna dei Lombardi, 36 — ROMA Belsiana, 60 — TORINO Carlo Alberto, 5. — GENOVA Piazza Fontane Marose.
PADOVA S. Fermo, 1261 — BOLOGNA Rizzoli 3. — PISA Lung'Arno, 20. — FIRENZE Alfani, 41. — PALERMO Corso V. Eman., 299
CATANIA — BARI — PAVIA

F 482
inv. 3283
XXVIII

Proprietà Letteraria

Stabilimento della Casa Editrice Dottor Francesco Vallardi
MILANO, Corso Magenta, 48.

PREFAZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE

I progressi rapidi, quasi impreveduti ed insperati, fatti in questi ultimi anni nello studio delle malattie d'infezione, sono dovuti per la più parte all'applicazione di una metodica logica, severa, quasi pedantesca. Di raro concetti teorici così larghi e generali si svolsero da un'osservazione così paziente e minuziosa, da un'esperimento tanto curato ne' più minuti particolari, e controllato ad ogni passo da una critica sagace, inesorabile. Di quante indagini, di quanti anni di lavoro questa critica ha dispersi al vento i risultati!

Quanto si è ottenuto finora, ha reso più sicura ma non più facile la via. Chi vuol provarsi a risolvere qualcuna delle infinite incognite, che comprende questo capitolo della patologia, o, più modesto, si contenta d'applicare alla pratica medica i risultati già ottenuti da altri, deve sapersi giovare di tutti gli ammennicoli, circondarsi di tutte le precauzioni che la scienza insegna ed esige. Il fare altrimenti, il pubblicare, come alcuni fanno, che, mettendo sotto il microscopio del sangue di Tizio, o degli essudati di Caio, hanno trovato dei micrococchi o dei bacilli, senza guarentirci intorno al modo con cui venne fatta l'osservazione, o senza curarsi di porre in sodo l'importanza eziologica dei microrganismi osservati, vuol dire aggiungere nuove scorie a quelle che ingombrano i cosidetti archivi della scienza, e dimostrare di esseri stati fermi, mentre la scienza ha progredito a galoppo.

In questo stato di cose mi parve che un libro, che raccogliesse e coordinasse tutte quelle nozioni intorno alla metodica della batteriologia, che si trovano sparse in un gran numero di lavori originali pubblicati in giornali difficilmente accessibili alla generalità degli studiosi, avrebbe dovuto tornare a questi ultimi di grande giovamento. E quando il Dott. Bordoni Uffreduzzi mi comunicò la sua intenzione di scrivere un libro su questo argomento, io lo incoraggiai caldamente a farlo.

Il Dott. Bordoni Uffreduzzi ha appreso praticamente la batteriologia nel pregiato laboratorio diretto a Monaco da un allievo di Koch, il Dott. Frobenius, e vi ha posto in applicazione le nozioni apprese, compiendovi un lavoro originale sulla pioemia dei vitelli neonati. Tornato in Italia, io gli diedi mezzi nel mio laboratorio di continuare i suoi studi; ed egli se ne giovò sia per attendere ad altri lavori originali, che verranno presto resi di pubblica ragione, sia per controllare i risultati altrui prima di accoglierli nel presente libro.

L'opera adunque, che il Dott. Bordoni Uffreduzzi offre al pubblico, non è una semplice compilazione. Concepita ed elaborata nell'esercizio pratico del laboratorio, essa tien conto di tutti i bisogni di chi s'inizia allo studio della batteriologia, lo guida passo passo, gl'insegna quali sieno le difficoltà da superare, i pericoli da sfuggire, gli scopi da raggiungere. — Ai capitoli risguardanti la metodica egli ha fatto precedere alcuni capitoli sulla biologia e sull'azione patogenica dei microrganismi, terminando colla descrizione biologica dei microparassiti noti finora; in modo che il lettore può trovare nel presente libro non solo come è fatto e come s'adopera lo strumento, ma anche ciò che si può ottenere per mezzo di esso.

Non conosco alcun libro di batteriologia, che presenti riuniti tutti codesti vantaggi. Ho perciò fede che il libro del Dott. Bordoni Uffreduzzi troverà favorevole accoglienza da parte degli studiosi.

Torino, Giugno 1885.

G. Bizzozero.

PREFAZIONE ALLA SECONDA EDIZIONE

Nell'introduzione dell'edizione precedente io scriveva « che il libro era fatto per servire di guida non solamente agli studiosi dei laboratorî, ma anche ai medici pratici », per quella parte che riguarda la diagnosi e la profilassi delle malattie infettive.

Se abbia, o no, raggiunto l'intento che mi era prefisso, non sta a me il giudicarlo. Basti dire soltanto che il lavoro ebbe dagli studiosi una benevola accoglienza; e lo prova il fatto che la prima edizione è esaurita da un pezzo, e che sarebbe già comparsa la nuova, se speciali circostanze, estranee alla mia volontà, non ne avessero fatto ritardare la ristampa.

Questo sia detto, malgrado che un traduttore (1) abbia, assai leggermente, lanciato contro di me l'accusa di avere sfruttato l'opera di un altro autore, senza neppure citarlo.

Io avrei volentieri lasciato che il pubblico scientifico giudicasse di per sè, come ha già fatto del resto assai diversamente da quello scrittore per bocca di un suo competentissimo rappresentante (2), se con me non fosse stato coinvolto nell'accusa il nome di tanto scienziato, quale è il Bizzozero, il quale volle con larghezza di appoggio e di consigli aiutarmi nell'impresa, e coonestarla apponendo il suo nome in testa del mio lavoro. Per dimostrare tutta quanta l'assurdità di un simile appunto, basti a me il ricordare la data di pubblicazione del manuale tedesco, che precedette il mio di *tre mesi*

---

(1) Van Ermengen. — Prefazione alla traduzione francese del manuale « *Die Methoden der Bacterienforschung* » di Hueppe.

(2) Baumgarten così si esprime, a riguardo del mio libro, in una rivista bibliografica, pubblicata nella *Berliner klinische Wochenschrift*, 1886, N. 17 e nella *Zeitschrift f. wissenschaftliche Mikroskopie*, Bd. III, Heft 1, 1886 (pag. 102)..... Mit vollkommener Literatur, und Sachkenntniss hat der Autor den hauptsächlichen Inhalt nahezu des gesammten umfangreichen, in die moderne Bacterienkunde einschlagenden, Beobachtungsmaterial in klarer Form zusammengestellt, und es ist die sachliche Treue der Angaben des Verf. ebenso sehr zu rühmen wie die objective Kritik, mit welcher er die historische Stellung und den actuellen Werth der einzelnen Leistungen auf den betreffenden Gebieten beurtheilt.....

soltanto, e che non citai neppure nelle note bibliografiche, perchè giunse a noi quando il mio libro era, non solo già scritto, ma quasi finito di stampare; cosicchè non potei trarre vantaggio dalla sua lettura, come avrei fatto certamente se fosse prima comparso. Confrontando infatti fra loro i due libri, è facile vedere come la intelaiatura intera dell'opera sia diversa, e come inoltre nel libro tedesco, per quanto la materia sia trattata con quella valentia e competenza, che tutti riconoscono nell'autore, non vi sia però nessuna novità *originale*, che possa giustificare un'accusa di plagio.

Attalchè, se rassomiglianza si trova nelle cose esposte, ciò significa soltanto che *tutti e due abbiamo attinto alla stessa fonte*, che è principalmente la scuola di Koch e di Pasteur, e che, sì l'uno che l'altro, non abbiamo fatto in sostanza che riprodurne gli insegnamenti, aggiungendovi quel tanto appreso coll'esperienza personale.

In questa seconda edizione ho fatto del mio meglio per portare il libro a livello delle cognizioni scientifiche odierne, valendomi sì dell'esperienza maggiore acquistata nel frattempo, come dei molti pregevoli lavori che hanno arricchito la letteratura batteriologica in questi ultimi anni. Di tutti i capitoli venne, dove più, dove meno, modificata la trattazione; alcuni anzi vennero aggiunti, o rifatti di sana pianta.

Molte figure di strumenti e di apparecchi nuovi vennero aggiunte nel testo, e furono fatti di bel nuovo i disegni cromolitografici delle varie forme di microrganismi patogeni, aggiungendone molti e togliendoli tutti da culture originali o da miei preparati, ad eccezione di quelli dei parassiti malarici, riprodotti da disegni di Marchiafava e Celli, e di Golgi. — Ho preferito riprodurre i preparati col disegno in cromolitografia, anzichè colla fotografia microscopica, perchè, trattandosi di un manuale pratico, ritengo più utile che lo studioso abbia sott'occhio l'imagine colorata del preparato, come si vede realmente al microscopio, e non quella incolora della fotografia, la quale riesce anche spesse volte imperfetta, specialmente se si tratta di sezioni.

Spero così di aver tolto di mezzo molti difetti, che esistevano nella prima edizione, e di avervi aggiunto quel tanto che era necessario, acciocchè il libro esprima lo stato attuale delle cognizioni batteriologiche nello studio dei microparassiti.

Torino, Febbraio 1894.

L'Autore.

INDICE DELLE MATERIE

Pag.

PREFAZIONE del Prof. Bizzozero alla 1.ª Edizione V
PREFAZIONE dell'Autore alla 2.ª Edizione VII

I. Cenni generali sulla morfologia e sulla biologia dei microrganismi 1

1. Nomenclatura 2
2. Classificazione 3
3. Rapporti normali coll'organismo animale vivente 7
4. Origine e struttura dell'individuo cellulare microbico 9
5. Sviluppo e riproduzione per mezzo di spore 12
6. Nutrizione 17
7. Azione dei microrganismi sui mezzi di nutrizione. Loro prodotti . . 20
8. Azione patogenica 28
9. Attenuazione 33
10. Immunità e innesto preventivo 37
11. Teorie dell'immunità 48
12. Influenza degli agenti esterni, fisici e chimici 55
    a) Azione della luce e dell'elettricità 55
    b) Azione della pressione e del movimento 58
    c) Azione della temperatura 59
    d) Azione del disseccamento 61
    e) Azione dei gas 62
    f) Azione dei reagenti chimici. Antisepsi e Disinfezione 63

II. Apparecchi e strumenti per le ricerche batteriologiche . . 74

1. Microscopio 74
    a) Obbiettivi ad immersione omogenea 74
    b) Apparecchio illuminatore di Abbe 76
    c) Microfotografia 80
2. Microtomo 83
    a) Inclusione in paraffina 88
    b) Inclusione in celloidina 90
3. Apparecchi per la sterilizzazione e per la preparazione delle sostanze nutritive 92
4. Stufe per culture o termostati. Termoregolatori 108
5. Piccoli stromenti ed oggetti diversi 117
6. Sterilizzazione 120

Pag

III. Sostanze coloranti e metodi di colorazione 125

1. Generalità 125
2. Sostanze coloranti 127
   a) Iodio 127
   b) Ematossilina 127
   c) Carmino 129
   d) Colori d'anilina 130
   e) Soluzioni coloranti 132
   f) Reattivi decoloranti 137
3. Metodi generali di colorazione 138
   a) Metodo di Weigert e sue modificazioni. 138
   b) Metodo di Koch 140
   c) Metodo di Gram 142
   d) Metodo di Koch-Löffler 144
   e) Metodo di Kühne 145
4. Metodi speciali di colorazione 147
   a) Colorazione delle ciglia 147
   b) Colorazione delle capsule 151
   c) Colorazione delle spore 152
   d) Colorazione dei bacilli tubercolari 154
   e) Colorazione del bacillo della lebbra 162
   f) Colorazione del bacillo del moccio e del tifo addominale . . . 163
   g) Colorazione dei bacilli della sifilide (Lustgarten) e di altri microrganismi 165
   h) Colorazione dei microfiti cutanei 168
   i) Valore ed importanza della colorazione 170
5. Ricerca dei microparassiti nell'organismo animale 173

A. Esame dei liquidi 175
   a) Esame diretto. Goccie pendenti 176
   b) Esame coi reattivi. Preparati sui coproggetti 178

B. Esame dei tessuti 187
6. Conservazione ed esame delle colonie batteriche 190

IV. Sostanze di nutrizione e metodi di cultura 194

1. Sostanze nutritive liquide 195
   a) Brodo 196
   b) Latte 198
2. Sostanze nutritive solide 199
   a) Patata 199
   b) Pappa di pane 202
   c) Gelatina e Agar nutritive 202
   d) Siero del sangue 215
3. Metodi di cultura 220
   a) Culture isolanti 220
   b) Culture nei tubi da saggio 234
   c) Culture anaerobiche 239

V. Trasmissibilità dei microrganismi patogeni. Innesti. Autopsie 252

1. Innesto cutaneo 255
2. Innesto sottocutaneo 256
3. Innesto nelle cavità sierose 258
4. Innesto nella camera oculare anteriore 258
5. Innesto endocranico 259
6. Iniezione intravenosa 259
7. Infezione per la via degli organi digerenti 260
8. Infezione per le vie respiratorie 262
9. Autopsie e raccolta dei materiali patologici 263

Pag.

VI. Esame dell'aria, dell'acqua e del terreno 268

1. Esame batteriologico dell'aria 269
2. Esame batteriologico dell'acqua 283
3. Esame batteriologico del terreno 296

VII. Descrizione biologica dei principali microparassiti . . . 301

1. Bacillo del carbonchio 301
2. Bacillo dell'edema maligno 310
3. Bacillo del carbonchio sintomatico 313
4. Bacillo del tetano 316
5. Bacillo della tubercolosi 324
6. Bacillo della lebbra 342
7. Bacillo della morva 348
8. Bacillo della difterite 352
9. Bacillo del tifo addominale 359
10. Bacillo di Lustgarten 371
11. Bacillo dell'influenza 372
12. Bacillo piocianeo e del pus verde 378
13. Bacillo della setticemia dei topi e del mal rosso dei suini . . . 381
14. Bacillo del coléra dei polli, o della setticemia emorragica . . . 382
15. Pneumobacillo di Friedländer. Bacillo del rinoscleroma 383
16. Proteo capsulato 384
17. Bacillus coli 387
18. Vibrione colerigeno 389
19. Vibrioni di Metschnikoff, di Deneke e di Finkler e Prior. . . . 414
20. Spirillo della febbre ricorrente (di Obermeyer) 415
21. Diplococco della polmonite crupale 416
22. Micrococco della gonorrea (Gonococco di Neisser) 422
23. Streptococco della risipola e streptococco piogeno 424
24. Micrococci piogeni 426
25. Micrococco tetragono 431
26. Actinomyces 432
27. Streptotrix (?) farcinica (Nocard). 437
28. Ifomiceti patogeni 438
29. Protozoi parassitarî 443

ERRATA - CORRIGE

Pagina	*Linea*	*invece di*	*si legga*
19	13	O	O libero
27	14	muscarina estratta dal merluzzo putrefatto	*sardinina* estratta dalle sardine putrefatte.
34	2	vivente	vivente che essi infettano naturalmente
74	27	Stephenson perfezionò	Lo stesso Amici cercò anche di perfezionare
74	28	liquido	liquido (essenza d'anici)
170	15	senza	presenza
276	17	moic	comi
320	21	lavi rulenza	la virulenza
366	38	colrea	coléra

438 dopo il carattere minuto si legga l'intestazione:

28. — **Ifomiceti patogeni.**

CAPITOLO I.

Cenni generali sulla morfologia e sulla biologia dei microrganismi

È utile far precedere anzitutto una breve esposizione delle proprietà biologiche principali, finora conosciute, di quella classe di funghi microscopici, a cui appartengono le specie che sono state riconosciute specifiche delle malattie da infezione.

Si è detto *funghi microscopici*, giacchè fin dal 1853 Cohn (1) ha positivamente stabilito la loro natura vegetale, per quanto però a rigor di termine non sia possibile una delimitazione precisa di questo gruppo di esseri viventi, di cui alcune specie hanno grandissima rassomiglianza con organismi del regno vegetale (*alghe*), ed altre invece rassomigliano ad organismi animali (*monadi*). Sicchè, più propriamente ancora, gli esseri in questione sono da riporsi in quel terzo regno della natura, chiamato da Haeckel regno dei Protisti, che sta quasi come ponte di passaggio fra quello animale e quello vegetale.

De-Bary (2) fa giustamente osservare che neppure la denominazione di funghi, data al gruppo che comprende i microrganismi patogeni, è esatta, poichè in questo sono compresi non solo i tallofiti privi di clorofilla, ma anche altre forme il cui protoplasma cellulare è provvisto di questa sostanza. Tali sono, ad esempio, le due forme trovate nell'acqua da Van Tieghem (3), e da questi descritte sotto il nome di « bacillus virens » e « bacterium viride », nonchè un'altra specie consimile descritta da Engelmann (4) col nome di « bacterium chlorinum ». Queste però non sono che rare eccezioni, e la maggior parte delle specie sono prive di clorofilla e rientrano per ciò nella classe dei funghi microscopici.

(1) Cohn, Nov. Act. Acad. Leop. Carol., 1853.

(2) De-Bary, *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze*, II Aufl. Leipzig, 1884.

(3) Van-Tieghem, *Sur quelques Bacteries vertes*, ecc., Bulletin Soc. bot. de France, t. 47, 1880, p. 174.

(4) Engelmann, *Zur Biologie der Schizomyceten*, Botanische Zeitung, 1882.

1. Nomenclatura.

Una prima cosa su cui converrebbe mettersi d'accordo è la loro nomenclatura. Ed invero chi per la prima volta si fa a leggere gli scritti molteplici, che trattano dell'argomento, può non di rado trovarsi in imbarazzo, incontrando nomi diversi applicati agli stessi esseri viventi.

Difatti Müller (1), che per primo li studiò col microscopio composto, li divise in due generi, che chiamò *Monas* e *Vibrio*. Dopo di lui Ehrenberg (2) li classificò fra gli infusorî, chiamandoli *vibrionidi* e distinguendo le quattro specie di *bacterium*, *vibrio*, *spirillum* e *spirochaete*. In seguito Pasteur li ha designati col nome di *funghi* e di *infusorî*, distinguendoli in *torulacee*, *batterî*, *vibrioni*, *monadi*, ecc. Béchamp ha proposto di chiamarli *microzimi*, Davaine *bacteridi*, Klebs li ha divisi in *microsporine* e *monadine*, Sedillot ha per primo proposto il nome generico di *microbi*, Nägeli li ha chiamati *scissomiceti* (*Spaltpilze*), nome che indica la loro proprietà di riprodursi per scissione, e finalmente Cohn e Koch li hanno raccolti tutti sotto il nome collettivo di *batterî*.

Tutta questa confusione di nomi dipende da ciò, che non si è ancora completamente d'accordo sulla classificazione di questi esseri microscopici; cosicchè, finchè la questione è *sub judice*, val meglio valersi, come appunto qui si farà, delle espressioni generali, equivalenti, di *microparassiti* o *microrganismi patogeni*, o semplicemente *microbi*, avvertendo soltanto che questi rientrano per la maggior parte nei così detti « scissomiceti » di Nageli, o « batterî » di Cohn e di Koch. E vero che il termine di microrganismi o microbi può essere applicato a questi esseri con egual ragione che ai funghi delle muffe e agli infusorî; ma d'altronde si ha così il vantaggio che, servendosi di una denominazione ampiamente generica, non si pregiudica affatto la questione per l'avvenire; mentre invece, designando esclusivamente col nome di *batterî* (da *bactyrion*, bastoncino) e con quello di *batteriologia* il ramo di scienza che se ne occupa, come si fa dalla maggior parte degli autori, si è in errore; sia perchè oltre i così detti batterî esistono anche altre specie di microrganismi che sono produttori di malat-

(1) Müller, *Animalcula infusoria fluviatilia et marina*, 1786.

(2) Ehrenberg, *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen*. Leipzig, 1838.

tia, come pure perchè altri potrebbero esserlo, che non si conoscono ancora. E difatti, per citare un esempio, il microparassita specifico della malaria non appartiene ai batterî, ma sibbene ai protozoi.

Del resto la questione della nomenclatura e della classificazione è cosa che interessa specialmente i botanici, e noi qui ne trattiamo solamente per quel tanto che può riuscirne utile dal nostro punto di vista.

2. Classificazione.

Una classificazione scientifica, sistematica e razionale, dei microrganismi manca tuttora; perchè la scienza è ancora lungi dal possedere cognizioni complete sulle condizioni loro di vita, sul modo di crescere, di nutrirsi e di riprodursi.

Una prima questione, d'indole assolutamente generale, tiene infatti diviso il campo in due scuole, fra loro opposte. Cohn, Koch e Flügge ammettono la costanza morfologica dei varî microrganismi patogeni e ritengono che le forme di cocco, di bacillo, di spirillo, e così via, sieno caratteristiche delle specie batteriche e rimangano costanti, tanto nell'organismo animale che li alberga come parassiti, quanto al di fuori di questo, in condizioni diverse di vita e di nutrizione.

Invece Billroth (1), Nägeli (2), Zopf (3) e Buchner (4) sostengono che le forme anzidette stieno tutte in rapporto genetico fra di loro, che sieno, cioè, semplici stadî di sviluppo di una sola specie, o tutt'al più di un numero di specie assai ristretto. Secondo questa teoria, da un unico stipite si potrebbero ottenere tutte le forme di microrganismi che si conoscono (micrococchi, bacilli e spirilli), variando semplicemente le condizioni di nutrizione (temperatura e composizione del substrato materiale), e si potrebbe egualmente una forma di micrococco cambiare, ad es., in un bacillo o in uno spirillo, e viceversa, cambiando soltanto le condizioni di sviluppo. Corrispondentemente a siffatto polimorfismo dei microbi, si ammette anche una variabilità delle loro proprietà fisiologiche e patogeniche,

(1) Billroth, *Untersuchungen über die Vegetationsformen der Coccobacteria septica*, Berlin, 1874.

(2) Nägeli, *Zur Umwandlung der Spaltpilzformen* in « *Untersuchungen über niedere Pilze, aus dem Pflanzenphysiologischen Institut in München* » 1882, pag. 130.

(3) Zopf, *Die Spaltpilze*, II Aufl., Breslau, 1884. È però da notare che nelle edizioni successive del suo libro l'autore si è ricreduto alquanto della sua opinione, ammettendo che alcune specie sieno polimorfe ed altre no.

(4) Buchner, *Kritik und Experim. über d. Frage v. d. Constanz d. pathog. Spaltpilze* (in Nägeli's *Untersuch. ü. nied. Pilze*).

fino ad ammettere che gli stessi microrganismi che noi alberghiamo in gran numero nel nostro intestino, i quali nelle condizioni ordinarie sono affatto innocui e sembra anzi coadiuvino l'azione dei succhi digerenti, possano in date circostanze divenire patogeni e produrre ad es. le febbri tifose; mentre viceversa gli stessi microbi, sviluppandosi fuori dell'organismo, si trasformerebbero di bel nuovo negli ordinarî ed innocenti bacilli delle feci. È noto che Buchner ha sostenuto altrettanto a riguardo del « bacillus subtilis » e del bacillo carbonchioso.

Una tale questione è stata molto dibattuta e merita invero di essere trattata, perchè importante non solo dal lato teorico, ma anche per la pratica. Se infatti fosse vero quanto sostengono Nägeli e gli altri, tutti gli studî che facciamo per distruggere questi esseri al difuori dell'organismo sarebbero senza scopo, dal momento che diretti a combattere agenti patogeni, che si possono riprodurre ad ogni istante da germi che si trovano sparsi dappertutto, e che sono inoltre capaci di cangiar natura altrettanto rapidamente per diventare innocenti. Per fortuna, però, le sostanze di nutrizione solide e trasparenti, introdotte da Koch nello studio dei microrganismi, permettendo di giudicare con criterî sicuri della purezza delle colture, hanno reso possibile la soluzione del problema. Potendo infatti esser certi della purezza delle colture, se, trasportando da uno ad un altro mezzo di nutrizione una forma batterica, isolata, pura, questa si riproduce costantemente, e per parecchie generazioni successive, sempre collo stesso aspetto e cogli stessi caratteri biologici che manifesta pure nell'organismo animale (se parassita), si può anche concludere con ragione, come fa Koch, alla costanza della forma batterica, la quale acquista perciò il diritto di essere classificata a sè quale specie distinta.

Bisogna però fare una certa restrizione all'affermazione assoluta di Cohn e di Koch e distinguere il concetto di *costanza della specie*, da quello della *costanza della forma e delle proprietà biologiche* dei microrganismi; giacchè mentre, come Koch afferma, è posta fuor d'ogni dubbio l'esistenza di diverse specie batteriche, che si differenziano fra loro per caratteri speciali morfologici e biologici, non può invece ammettersi pei batterî una costanza assoluta delle proprietà loro morfologiche e fisiologiche.

Esistono infatti, anzitutto, alcune specie batteriche, le quali compiono un ciclo di sviluppo più ampio delle altre e manifestano in esso forme diverse, di cocco, di bacillo e di spirillo. Non intendiamo citare per ciò l'esempio delle Crenotricee, Cladotricee e Beggiatoe, delle quali non si può dire con certezza che appartengano alla classe degli scissomiceti; ma intendiamo invece alludere specialmente ai mi-

crorganismi de genere Proteo, studiati ma da Hauser (1), i quali sono veramente polimorfi, giacchè durante il loro sviluppo si manifestano con forme tondeggianti ed allungate, a mo' di cocco, di bacillo, di filamento ed anche di spirillo.

Questi microrganismi, pure appartenendo alla categoria degli scissomiceti, si potrebbe dire quasi che rappresentano un anello di congiunzione fra questi e gli ifomiceti; giacchè mentre le forme di cocco e di bacillo si producono indubbiamen e per scissione, i filamenti invece appaiono spesso uniformi, senza traccia di segmentazione, e di varia grossezza nel loro decorso, come derivanti da allungamento dell'individuo primitivo.

Questo però non contradice punto alla legge della costanza della specie, giacchè il ciclo di sviluppo dei protei, restando uguali le condizioni di vita esterna (temperatura e mezzo di nutrizione), si manifesta sempre lo stesso, e costituisce quindi una caratteristica della specie, fissa e costante.

Ma, oltre a ciò, si verificano in una data specie di microrganismi alcune modificazioni di forma e di proprietà, in relazione colle diverse condizioni di vita, che sono importanti a conoscersi, per non cadere in errore.

Una prima serie di variazioni morfologiche, che chiameremo *naturali*, è dovuta alle condizioni esterne di vita e specialmente alla temperatura e al mezzo di nutrizione. Tanto più queste si avvicinano all'*optimum* speciale per ciascun microrganismo, e tanto più il suo sviluppo è rigoglioso e le forme appaiono quindi più completamente sviluppate. Viceversa, se quelle condizioni sono poco propizie, l'accrescimento è stentato e meschino, e spesso appaiono forme bizzarre, quasi patologiche, che sono state dette da Nägeli « forme involutive » e che non rassomigliano punto alla forma tipica della specie batterica. Così il bacillo del carbonchio, coltivato sulla patata a bassa temperatura, mostra a lato delle forme tipiche di bacillo, lunghe e regolari, altre forme tondeggianti ed irregolari, le quali non sono altro che forme degenerate, dovute alle condizioni di vita poco favorevoli. Esse infatti scompaiono nelle generazioni successive, non appena il bacillo si fa sviluppare in condizioni migliori di temperatura e di nutrizione, mentre le forme tipiche e regolari costituiscono un carattere fisso, costante ed ereditario. Le variazioni di forma, adunque, che si manifestano in un dato microrganismo a seconda della temperatura o del mezzo di nutrizione in cui si fa sviluppare, non sono mai di tal natura da far perdere ad esso la caratteristica della specie.

Un'altra serie di cambiamenti di forma, *artificiali*, sono poi dovuti ai metodi che noi usiamo per preparare e studiare i microrganismi. Già il semplice riscaldamento, necessario per fissare i preparati sui vetrini coproggetti, serve ad alterare a rma dei batterî, ed in varia maniera a seconda del grado di riscaldamento. Anche l'impregnazione coi colori d'anilina li fa apparire più o meno grossi, a seconda del colore che si adopera ed a seconda del metodo di colorazione. Oltre a ciò, i reattivi coloranti mettono in evidenza talora nell'interno dei microrganismi la presenza di granuli, o di spazî chiari, che servono a modificare non poco il loro aspetto naturale. Finalmente la coartazione prodotta dell'alcool, che serve ad indurire i tessuti di cui si vuol fare sezioni microscopiche, altera pure in un certo grado la forma dei microbi che vi sono contenuti.

Non è soltanto la forma, ma sono anche le proprietà fisiologiche dei batterî che vanno soggette a variazioni, anche più notevoli di quelle morfologiche. Così i microrganismi patogeni, sotto l'influenza di speciali condizioni, possono perdere affatto la loro virulenza (attenuazione); e questa nuova proprietà può anche diventare costante ed ereditaria, come avviene pel bacillo carbonchioso attenuato me

(1) Hauser, *Ueber Fäulnissbacterien*, Leipzig, 1885.

diante lo sviluppo ad una temperatura di 42-43° C. Questo stesso bacillo ci offre anche un altro esempio interessante di cangiamento di proprietà biologiche, potendo esso, coltivato in certe condizioni, diventare *asporogeno,* ossia perdere la facoltà di formare le spore, mentre è sporigeno in condizioni ordinarie.

Tutto questo però ne insegna soltanto, che anche i microrganismi ubbidiscono alle stesse leggi degli altri esseri viventi, che, cioè, anche in essi, sotto l'influenza delle variate condizioni di vita, si possono produrre nuove proprietà, che conducono alla formazione di *varietà* novelle. Ciò per quanto ne è dato apprendere colla nostra osservazione; ma, oltre a ciò, dobbiamo ammettere, anche pei microrganismi, che entro lunghi periodi di tempo si producano modificazioni di forma e di proprietà tali, da condurre alla formazione di specie nuove. Quanto alla forma però, giudicando dai fatti finora conosciuti, secondo i quali, ad es., nel tartaro dei denti delle mummie egiziane si sono trovate le stesse forme batteriche, che si trovano ora nella bocca (Zopf e Müller), siamo condotti a credere che tali variazioni si compiano in questi esseri soltanto assai lentamente.

Possiamo adunque conchiudere che anche nei batterî si possono distinguere generi e specie diverse, le quali, entro i limiti cronologici permessi alla nostra osservazione, sono fisse e costanti, e non mutevoli le une nelle altre, secondo le condizioni esterne di nutrizione e di temperatura. Avvertiamo soltanto che, per ben definire una specie batterica, bisogna tener conto, non solo della forma, ma sibbene di tutte quante le proprietà morfologiche e fisiopatogeniche, comprese anche quelle di cultura e di colorazione.

Definita così la questione della costanza morfologica delle specie batteriche, esponiamo qui, nelle sue linee principali, la classificazione di Cohn, che è basata appunto sulla loro forma e che, per quanto debba essere provvisoria, perchè unilaterale e basata su di un solo carattere, tuttavia è la più semplice di quelle finora proposte e serve specialmente per avere una norma nello studio e nella descrizione dei microrganismi patogeni.

Secondo la forma, possiamo distinguere i batterî in tre categorie:

A) Batterî a forma sferica, detti *micrococchi*, i quali si possono paragonarsi ad una palla da bigliardo, oppure ad un uovo, secondo che sono perfettamente rotondi od allungati. Di questi vi sono parecchie specie, distinte specialmente secondo la maniera di raggrupparsi delle cellule batteriche fra di loro.

B) Batterî a forma cilindrica, allungata, detti *bacilli*, i quali si presentano isolati, oppure riuniti insieme, sotto forma di filamenti. Ve ne sono dei lunghi e dei corti, i quali ultimi da Cohn erano distinti specialmente col nome di *batterî*.

C) Batterî ricurvi a mo' di spirale, detti *spirilli*, aventi la forma di cavaturaccioli. Gli spirilli possono essere unici, oppure formati dalla riunione di parecchi bastoncini ricurvi, virgoliformi.

A complemento di questa semplice classificazione, aggiungiamo che, allorquando i micrococchi si trovano riuniti in forma di catena, si designano col nome speciale di *streptococchi* o *torule*, e se invece formano ammassi irregolari, diconsi *stafilococchi*.

Così i bacilli, se moltiplicandosi restano uniti fra di loro, costituiscono filamenti, detti *leptotrix*, i quali si distinguono dai micelì delle muffe perchè non sono mai ramificati.

Finalmente i bastoncini ripiegati a forma di spira hanno più propriamente il nome di *spirillo*, quando le spire sono grosse ed allungate, e di *spirocete*, quando invece le spire sono corte e sottili, oppure di *spirulina*, allorquando le estremità di un filamento sono intrecciate fra di loro.

Un tentativo di classificazione più razionale è stato fatto da De Bary, prendendo per base una delle proprietà biologiche più importanti dei microrganismi, che è la formazione di spore, e facendo la distinzione di due gruppi fondamentali di batterî: *a*) di quelli che hanno la formazione di spore endogena, *batterî endosporiacei*, *b*) di quelli senza sporificazione endogena, *batterî artrosporiacei*.

Hueppe (1), seguendo le orme di De Bary, ha voluto fare una classificazione completa, suddividendo in generi e specie le due categorie anzidette. Questa classificazione però, oltre ad essere molto complicata, non ha ancora un fondamento sicuro, sia perchè da molti è ancora messa in dubbio l'esistenza delle così dette « artrospore », come anche perchè per la maggior parte, quasi, delle specie batteriche non si conosce ancora alcuna sorta di sporificazione.

3. Rapporti normali dei microbi coll'organismo animale vivente.

Per lo studio dell'eziologia delle malattie infettive, le quali sono prodotte dall'invasione di microparassiti nell'interno dell'organismo animale vivente, era interessante anzitutto precisare con certezza quali rapporti assumono normalmente con quello i microrganismi, i quali sono sparsi dappertutto nel mondo esterno e si rinvengono quindi anche normalmente, in grande abbondanza, sulla superficie interna ed esterna del nostro corpo. Sulla superficie esterna vi sono depositati dall'aria e dai diversi corpi che vengono con essa a contatto; alla superficie interna (mucosa dell'apparecchio respiratorio e digerente) arrivano per mezzo dell'aria e degli alimenti. Difatti, ospiti di tal genere, per lo più innocui, almeno finchè il loro moltiplicarsi non eccede certi limiti, chiamati appunto « parassiti normali » (meglio sarebbe chiamarli « commensali ») si trovano in gran

1) Hueppe, *Die Methoden der Bacterienforschung*, IV Aufl. 1889.

copia nella mucosa di tutto l'apparecchio digerente e respiratorio, come in quella degli organi sessuali, nella patina dentaria, sui peli e sulla pelle, dove furono prima studiati da Bizzozero (1) nelle loro proprietà morfologiche e da me (2), e in seguito anche da altri, a riguardo delle loro proprietà biologiche principali.

Era però necessario stabilire con precisione se tali germi, dirò così accidentali, si trovano, o no, anche nell'interno dell'animale vivente, nel sangue, cioè, e negli organi che non hanno alcun rapporto diretto col mondo esterno; ed era necessario, per togliere il dubbio che la presenza di microrganismi nell'interno dei tessuti ammalati, anzichè avere un'importanza eziologica per la malattia stessa, non fosse invece che un reperto comune.

Tale questione è stata per lo addietro vivamente dibattuta, e le ricerche primitive di Nägeli, di Billroth e di Nencki e Giacosa parevano aver dimostrato che nel sangue, come nell'interno di organi perfettamente normali e privi di qualsiasi comunicazione col mondo esterno, si trovano sempre i germi della putrefazione. In seguito però, col perfezionarsi dei metodi di indagine batteriologica, quest'opinione andò, a mano a mano ,perdendo terreno e le ricerche più esatte di Meissner, di Zahn, di Fodor e specialmente di Hauser (3) dimostrarono indubbiamente, sia per mezzo dell'osservazione microscopica, come colle culture, che nell'interno dei tessuti nell'organismo animale, *sano e vivente*, non esistono germi, capaci di sviluppo.

È da notare però che i germi saprofitici, che si trovano sulla superficie del corpo animale, possono talora penetrare anche per un certo tratto nello spessore dei tegumenti, là dove trovano, in modo speciale, condizioni favorevoli alla loro penetrazione. Così le osservazioni, fatte quasi contemporaneamente da Bizzozero (4) e da Ribbert (5), indipendentemente l'uno dall'altro, hanno dimostrato che nell'assorbimento del chimo dall'intestino possono talora venire assorbiti anche alcuni degli innumerevoli microrganismi che vi sono contenuti. Nei follicoli linfatici del processo vermiforme e del *sacculus rotundus* del coniglio normale si trovano difatti numerose forme di microrganismi, i quali per la maggior parte sono contenuti nell'interno di cellule linfatiche ipertrofiche.

(1) Bizzozero, *Ueber die Mikrophyten der normalen Oberhaut des Menschen,* Virchow's Archiv, 1884, Bd. 98.

(2) Bordoni-Uffreduzzi, *Ueber die biologischen Eigenschaften der normalen Haut-mikrophyten*, Fortschritte der Medicin, N. 5, 1886.

(3) Hauser, *Ueber das Vorkommen der Mikroorganismen im lebenden Gewebe der normalen thierischen Organismus*, Cbl. f. d. med. Wiss. N. 22, 1884.

(4) Bizzozero, *Sulla presenza costante dei batterî nei follicoli linfatici dell'intestino di coniglio*, Gazzetta delle Cliniche, 17 Marzo 1885. — Centralblatt f. d. med. Wissenschaften, N. 45, 1885. — Archivio delle Scienze mediche, Vol. IX, Fasc. 4, 1886.

(5) Ribbert, *Ueber das Vorkommen von Spaltpilzen in der normalen Darmwand des Kaninchens*, Deutsche med. Wochenschrift, N. 13, 26 Marzo 1885.

Questi batterî bensì non oltrepassano mai lo strato dei follicoli linfatici e, colorati col metodo di Gram, appaiono tinti debolmente, con contorni poco netti, spesso anche sotto forma di detriti granulosi; ciò che fa già supporre che abbiano perduto qualsiasi vitalità. La prova sperimentale di ciò fu anzi data da Manfredi (1), il quale ha visto riuscire costantemente infruttuosi i tentativi di cultura, fatti collo strato di tessuto, dove si trovano quei microrganismi.

Il fatto ora accennato non prova adunque che nell'interno dell'organismo sano e vivente esistano germi capaci di sviluppo, ma prova soltanto che in certe località del corpo possono esistere, anche normalmente, condizioni favorevoli alla penetrazione dei microrganismi; e questo si verifica per l'appunto in quella porzione dell'intestino del coniglio, dove le cellule epiteliali, che ricoprono la superficie dei follicoli linfatici, sono rarefatte ed allontanate l'una dall'altra, per opera dei numerosi leucociti che vi passano continuamente attraverso. E difatti i germi, che penetrano per questi spazî intercellulari, non arrivano mai al di là dei follicoli linfatici, perchè muoiono appena entrati, sia per opera dell'azione digerente degli elementi cellulari (fagocitosi), e sia più probabilmente perchè, essendo saprofiti, non hanno la facoltà di nutrirsi a spese della sostanza organica vivente (2).

4. Origine e struttura dell'individuo cellulare microbico.

La prima comparsa di questi esseri microscopici nel mondo dei viventi non si sa bene precisare a quale epoca appartenga. Si sa soltanto che essa è anteriore all'ultimo periodo geologico, e che già nel periodo del carbon fossile esistevano i microrganismi. Van Tieghem (3), esaminando sezioni sottili delle radici di conifere fossili del periodo carbonifero, trovò, quà e colà, nella corteccia e nel tessuto interstiziale dei fasci vascolari, alcuni ammassi di un batterio, perfettamente simile al *bacillus butyricus* nei suoi varî stadî di sviluppo, sotto forma di bacilli, isolati o riuniti in filamenti, e di cellule fusiformi contenenti le spore.

Zopf (4) e Müller hanno poi osservato nell'incrostamento dei denti delle mummie egiziane una forma di fungo microscopico, simile affatto all'odierno « Leptotrix buccalis ».

I singoli microrganismi, di varia forma, come si è già detto, hanno anche una grandezza variabile da 0,1 a 1 fino a 10 μ (per lo più 1 μ), e devono considerarsi come veri individui cellulari,

(1) Manfredi, *Sulla presenza di batterî morti nei follicoli dell' intestino di coniglio*, Giornale internazionale delle Scienze mediche, fasc. 4, 1886.

(2) Recentemente Bizzozero ha anche osservato la presenza costante di spirilli nel lume delle ghiandole dello stomaco, tanto nella regione del piloro che in quella del fondo, dello stomaco, nel cane sano. Gli stessi spirilli si trovano anche nel protoplasma delle cellule delomorfe, che stanno in vicinanza del colletto ghiandolare, e persino in quelle che stanno fra le cellule mucipare dell'epitelio di rivestimento dello stomaco. Non si sa però ancora se tali spirilli sieno viventi, oppure no (*Comunicazione fatta all'Accad. med. di Torino. Seduta del 18 Marzo 1892.* — Giorn. della R. Accad. med. di Torino, 1892 pag. 205).

(3) Comptes Rendus, 1879.

(4) Zopf, Opera citata.

simili affatto, pel loro modo di crescere e di moltiplicarsi, alle cellule vegetali ed animali. Anche la loro struttura anatomica, per quanto finora se ne conosce, si accorda col loro carattere cellulare. Difatti in tutti i microrganismi si distingue chiaramente un contenuto protoplasmatico ed una membrana cellulare involgente: mancava finora la dimostrazione della presenza d'un nucleo, per rendere completa la somiglianza; ma ricerche più attente (1), fatte specialmente col sussidio dei mezzi ottici perfezionati, hanno rivelato, nelle forme di bastoncino come in quelle di cocco, tanto allo stato naturale che nei preparati colorati debolmente, un corpo centrale, allungato o rotondo, circondato dal protoplasma, che si divide in due metà prima che avvenga la scissione dell'individuo cellulare, e che ha quindi i caratteri di un vero *nucleo*.

La *membrana* è costituita, per lo più, da una sostanza ternaria, affine alla cellulosa; in alcuni microrganismi però, secondo le ricerche di Nencki, sarebbe costituita dalla stessa sostanza albuminoide, detta *micoproteina*, che costituisce pure il corpo della cellula.

In ogni caso la membrana deve considerarsi come lo strato interno, più compatto, di una capsula gelatinosa che avvolge i singoli individui microbici.

Questo ci spiega come la stessa membrana possa facilmente rigonfiarsi negli strati più esterni, e costituire quell'involucro gelatinoso, speciale, che si osserva attorno a certi microrganismi (pneumobacillo di Friedländer, proteo capsulato, ecc.) e che va col nome di *capsula*.

Lo stesso fatto spiega pure il rimanere fra di loro aderenti le cellule figlie nell'atto che si producono per scissione, formando così quegli aggregati di microrganismi, che son detti *diplococchi*, *streptococchi*, *stafilococchi*, *micoderma*, o *zooglee*, secondo la loro forma e secondo la loro estensione.

Queste ultime (zooglee) si osservano specialmente nelle culture dei microrganismi fatte nei mezzi liquidi, oppure nei mezzi solidi (gelatina) liquefatti per opera del loro sviluppo, dove formano una specie di pellicola superficiale: esse hanno forma ed aspetto diversi, secondo le varie specie microbiche, e costituiscono per ciò una delle caratteristiche morfologiche della specie.

Il *contenuto cellulare protoplasmatico* è generalmente ialino, più refrangente dell'acqua, omogeneo nello stadio di piena vege-

(1) Schottelius, *Beobachtung kernartiger Körper im Innern von Spaltpilzen*, Centralbl. f. Bacteriologie IV Bd. N. 23, 1888. — Ernst, *Ueber Kern- und Sporenbildung in Bacterien*. Zeitschrift f. Hygiene, Bd. V, 1889.

tazione e contenente in alcune specie granuli numerosi di zolfo; vi si osservano spesso vacuoli, di cui si ignora finora il significato.

Secondo le ricerche di Nencki, il protoplasma è costituito da micoproteina, sostanza composta da 52,32 % C, 7,55 % H, 14,75 % Az, 25,38 % O, la quale non contiene nè zolfo nè fosforo ed è facilmente solubile negli acidi e negli alcali. Da ricerche ulteriori però, fatte dallo stesso autore sulla composizione dei bacilli carbonchiosi (1), risulterebbe che questi bacilli contengono micoproteina soltanto in piccola quantità, e sono invece per la maggior parte costituiti da un albuminoide simile alla mucina, che egli chiama perciò *micomucina*, solubile negli alcali solamente.

In alcune poche specie il protoplasma contiene clorofilla; talora vi esiste pure una sostanza amiloide, la *granulosa*, che si colora in azzurro col jodio (*Leptotrix buccalis*) e che pare sia più abbondante nel periodo che precede la formazione delle spore.

Probabilmente esiste pure una struttura della cellula microbica, ma i dettagli non sono peranco conosciuti. Finora sappiamo soltanto che il protoplasma cellulare non reagisce uniformemente ai colori basici d'anilina e che vi sono alcune parti che si colorano di più, ed altre che si colorano meno intensamente (2); ma quale significato abbia questo fatto non lo sappiamo ancora.

Secondo alcuni nel protoplasma cellulare avverrebbe pure la formazione del pigmento, nelle specie cromogene; ma tale opinione, secondo osservazioni recenti, non appare più fondata di quella che ammette che il pigmento esista nella membrana cellulare. Molto probabilmente invece il pigmento si forma fuori delle cellule e si trova, o sotto forma di granuli insolubili nella sostanza intercellulare delle zooglee (bacillo prodigioso), oppure, essendo facilmente solubile, si diffonde e colora il mezzo nutritivo (bacillo fluorescente).

Un altro costituente importante della cellula batterica, che esiste però soltanto nelle specie dotate di movimenti proprî, è rappresentato dalle *ciglia*, le quali sono veri *organi di movimento* dei microrganismi.

Per vedere tali organi, la cui esistenza era già conosciuta da Ehrenberg, bisogna, o ricorrere alla fotografia dei preparati incolori, semplicemente disseccati, come ha fatto Koch, oppure, meglio, valersi di processi speciali di colorazione; giacchè nello stato

(1) Nencki, *Chemische Zusammensetzung der Milzbrandbacillen*, Gazeta lekarska, $^{34}/_{84}$.

(2) Buchner, *Ueber die vermeintlichen Sporen der Typhusbacillen*. Centralblatt f. Bacteriologie, IV Bd. N. 12, 1888. — Babes, *Ueber isolirt färbbare Antheile von Bacterien*, Zeitschrift f. Hygiene, V Bd. erstes Heft, 1888.

naturale, sia in causa del vivace loro movimento, sia perchè hanno un indice di refrazione quasi uguale a quello dei mezzi in cui si osservano (acqua, brodo), riesce quasi impossibile vederli.

Si deve a Löffler lo aver trovato un metodo di colorazione, che serve a colorare sicuramente e chiaramente queste ciglia; e l'applicazione di questo metodo ha già portato a risultati interessanti, riguardo alle particolarità di esse. Così si è trovato che non soltanto i bacilli e gli spirilli, ma anche le specie mobili di micrococco (micrococcus agilis) ne sono provviste: si è trovato inoltre che alcuni microrganismi hanno un solo ciglio (bacillo del colera) ed altri invece ne hanno parecchi, ad una o ad ambedue le loro estremità, mentre altri ancora (bacillo del tifo) hanno le ciglia soltanto lateralmente, lungo l'asse maggiore.

I movimenti proprî dei microrganismi sono legati a speciali condizioni del substrato materiale che li alberga e li nutrisce, rappresentate principalmente dalla temperatura e dalla presenza dell'ossigeno.

La forma di questi movimenti è varia; talvolta consiste in una rotazione intorno all'asse longitudinale, tal'altra invece in un alternativo piegarsi e distendersi dell'individuo cellulare, e sta in relazione col numero e colla posizione delle ciglia.

Se si osservano al microscopio questi piccoli individui cellulari, sospesi in un liquido, si vedono continuamente in preda ad un vivace movimento danzante (movimento molecolare di Brown), che è dovuto all'energia molecolare e che si può facilmente scambiare coi movimenti proprî dei microbi. Talora anzi riesce assai difficile distinguere, l'una dall'altra, queste due specie di movimenti, ed il criterio differenziale più sicuro si ha nel variare quelle condizioni esterne, le quali diminuiscono o sopprimono i movimenti autonomi, senza avere un' influenza spiccata sul movimento browniano.

5. Sviluppo e Riproduzione per mezzo di spore.

Il moltiplicarsi dei batterî succede ordinariamente per semplice *scissione*, e da ciò appunto deriva il loro nome generico di *scissomiceti*. La cellula si allunga, la membrana manda un sepimento nell'interno e si hanno così due nuovi individui. Secondo le osservazioni di Schottelius, si avrebbe pure la scissione del corpuscolo centrale, rappresentante il nucleo. La scissione si compie in generale assai rapidamente; a 35° C. quella di un bacillo si compie in venti minuti all'incirca. Si comprende quindi di leggieri come debba essere straordinariamente grande la moltiplicazione dei microrganismi, considerata anche nello spazio di sole 24 ore.

Questa scissione nei batterî cocciformi può farsi in qualsiasi direzione. Se avviene in un solo senso, la cellula figlia, rimanendo attaccata a quella primitiva, può costituire una semplice coppia

(*dipiococco*), oppure una catena di parecchi individui cellulari disposti in fila (*streptococco*), o finalmente una serie di piccoli ammassi (*stafilococco*). Se la divisione si fa contemporaneamente in tutte e tre le direzioni dello spazio, ne risulta un'aggregazione cubica di cocchi, che ha preso il nome di *sarcina*, per la sua somiglianza ad una balla di mercanzia; se invece si fa in due direzioni soltanto (in croce), si ha la forma di *tetragono* o *merismopedia* (Zopf), la quale è costituita dell'aggregazione di 4 cellule disposte in superficie. La sarcina, se completa, è adunque composta dall'aggregazione di sedici individui cellulari, mentre la merismopedia lo è da quattro soltanto.

Nei bacilli invece la scissione si fa soltanto nel diametro trasversale; cosicchè, quando i singoli individui rimangono uniti fra di loro, costituiscono semplicemente filamenti più o meno lunghi (*leptotrix*).

A lato però di questa semplice forma vegetativa dei microrganismi, ne esiste pure, in certe specie e sotto determinate condizioni, un'altra di vera *riproduzione*, o meglio di *fruttificazione*, per mezzo di organi speciali detti *spore*, le quali si formano nell'interno della cellula stessa e sono state osservate finora sicuramente soltanto nelle forme di bacillo e di spirillo.

Le condizioni necessarie a che si producano spore non sono ancora bene determinate; si può dire soltanto che un dato grado di temperatura e di umidità del mezzo, una certa composizione e reazione del substrato nutritivo, una certa età della coltura e talora anche la presenza dell'ossigeno sono necessarî per avere lo stadio di fruttificazione di questi esseri.

Si ritenea prima che condizione indispensabile alla produzione di spore fosse l'esaurimento del materiale di nutrizione; il che si collegava col concetto teleologico che questi esseri, allorquando fosse loro impedito l'ulteriore sviluppo e minacciata quindi l'esistenza, producessero una nuova forma, la spora, la quale, essendo molto resistente assicurava la vita della specie. Ciò realmente non è; giacchè è positivamente dimostrato che gli organi di fruttificazione compaiono quando evvi ancora materiale nutritivo disponibile, e l'accrescimento dei microrganismi non è peranco impedito dall'accumularsi dei prodotti dello scambio materiale.

Le diverse condizioni sopraccennate entrano in azione, or l'una or l'altra diversamente, per la produzione delle spore nelle varie specie di microbi. Fra tutte però la temperatura è quella che esercita l'influenza più spiccata. Pel bacillo del carbonchio, ad es., Koch ha trovato che le spore non si formano che ad una temperatura oscillante fra 20 e 37° C., e che il grado ottimo è di circa 30° C. Così riguardo all'ossigeno, Neisser (1) ha osservato che nei così detti bacilli della

(1) Neisser, *Versuche über die Sporenbildung*, ecc. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. IV. Heft. 2, 1888.

xerosi, senza un' abbondante quantità di O, non si ottiene che una scarsa ed incompleta sporificazione. Lo stesso avviene pel bacillo del carbonchio.

Come vi ha un *optimum* nel grado di temperatura e nella quantità di O, così per la sporificazione si ha un limite ottimo di reazione (neutra, alcalina od acida) e di composizione del substrato nutritivo; cose tutte di cui bisogna tenere conto esatto, allorquando si vuol determinare se una specie è, o no, capace di riprodursi per mezzo di spore. Si dirà in seguito di quale interesse sia per l' igiene la conoscenza sicura di questo fatto.

Una particolarità biologica interessante, riguardo al fatto della sporificazione, è quella osservata da Roux, da Lehman e da Behring, che, cioè, certe condizioni di vita, poco favorevoli, possono far perdere per sempre ai batterî sporigeni la facoltà di produrre le spore, trasformandoli così in batterî « asporogeni ».

Alcuni osservatori ritengono si possa distinguere una doppia maniera di formazione delle spore: *sporificazione endogena* ed *artrosporificazione*. Il primo modo soltanto però è stato positivamente dimostrato in molte specie di microbi, e consiste nella comparsa nell'interno dell'individuo cellulare di un nuovo elemento, la *spora*, avente composizione chimica e proprietà fisiche, diverse da quelle del protoplasma cellulare.

La formazione delle spore nell'interno delle cellule vegetative avviene per ciò che il protoplasma, scacciando l'acqua di cui è imbibito, si inspessisce sotto forma di un corpo, ovale o rotondo, fortemente rifrangente, il quale si circonda di una membrana compatta e diviene poi libero in seguito al disfacimento della membrana cellulare primitiva. Una tale *sporificazione*, nel vero senso della parola, si osserva specialmente nelle forme di bacillo e di spirillo, per quanto alcuni asseriscano di averla osservata anche nei micrococchi (Hauser (1), Prove (2)).

Il secondo modo invece consisterebbe in una trasformazione di tutto il protoplasma cellulare, per cui esso acquisterebbe proprietà fisiche e chimiche diverse, trasformandosi in *artrospora*, senza aversi la neoformazione endogena di un organo speciale, come nel primo caso. Cosicchè le artrospore si distinguerebbero dalle forme vegetative ordinarie, soltanto per la maggiore loro resistenza agli agenti di distruzione e per la proprietà di riprodurre nuove colonie di microrganismi.

Secondo una tale opinione, in tutte le forme, nelle quali non è possibile dimostrare una sporificazione endogena, si avrebbe invece un' artrosporificazione, la quale, rendendo i microrganismi più resistenti, servirebbe ugualmente per la con-

(1) Hauser, *Ueber Lungensarcine*. Deutsches Archiv. für klinische Medicin, Festschrift Herrn Prof. Zenker, 1887.

(2) Prove, *Micrococcus ochroleucus*. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd IV Heft 3, 1887.

servazione della specie. Questa però è un'ipotesi non convalidata, finora, da fatti bene accertati; cosicchè il voler ritenere come base di una classificazione (De-Bary, Hueppe) la differenza fra questi due modi di sporificazione non appare ancora abbastanza giustificato. Diremo anzi che studî accurati fatti da Prazmowsky (1) hanno dimostrato che in certe forme di microbi assai minuti, classificati finora fra gli artrosporiacei, si ha invece la formazione delle spore, come nelle forme più grosse a sporificazione indubbiamente endogena. Si può quindi concludere che le nostre conoscenze attuali non permettono di distinguere due forme diverse di sporificazione, e che in quei casi, nei quali si è ammessa la forma artrosporiacea (Leuconostoe, Bacterium Zopfii, ecc.), si tratta di microrganismi, nei quali era impossibile seguire tutto il processo nei suoi particolari, in causa della picciolezza degli individui cellulari, oppure in causa della loro forma speciale.

Il modo con cui si formano le spore, come anche la loro germinazione diversificano alquanto nelle varie forme di microbi.

Cohn, Koch, Brefeld, Prazmowsky, De-Bary, hanno studiato direttamente col microscopio questo fenomeno in alcune forme di bacilli, ed hanno visto che in generale l'inizio della sporificazione è contrassegnato dalla comparsa di punti brillanti nel protoplasma cellulare. Questi a poco a poco confluiscono, finchè ne risulta quel corpo splendente, di forma per lo più ovale, od anche rotonda, che è la spora, circondata da un contorno oscuro, regolare, che rappresenta la membrana involgente. Il resto del protoplasma cellulare si fa sempre più pallido, finchè si scioglie e lascia libera la spora, che è allora matura.

Ogni individuo cellulare produce di regola una sola spora. In qualche specie di bacilli si è però osservato anche la formazione di due spore in una sola cellula madre (2).

La spora si trova o nel mezzo del bacillo o ad una delle sue estremità. Nel primo caso spesso il bacillo si rigonfia in forma di fuso e prende il nome di « Clostridio» (B. Butyricus, B. epidermidis); nel secondo caso invece diventa capocchiato o spilliforme (B. del tetano). Altre volte poi i bacilli si allungano prima in filamenti e nell'interno di questi compaiono le spore, disposte a mo' di coroncina di rosario (B. del carbonchio), senza alterare la forma del bacillo.

La spora può essere più piccola, eguale, o più grossa dell'elemento cellulare da cui è formata. Consta di un contenuto, la cui natura chimica non è ancora esattamente determinata, e di una membrana, che secondo alcuni è semplice e secondo altri è doppia (eso ed endospora). Questa è la parte più importante della spora,

(1) Prazmowsky, *Ueber Sporenbildung bei den Bacterien*, Biologisches Centralblatt, N. 10, 1888.

(2) A. Koch, *Ueber Morphologie und Entwickelungsgeschichte einiger endosporen Bacterienarten*, Botan. Zeit. 1888, N. 18-22.

giacchè è appunto la membrana, la quale, essendo spessa e resistente, conferisce loro un potere di resistenza, assai maggiore di quello delle cellule vegetative semplici.

Il fatto della sporificazione è importante anzitutto dal punto di vista biologico, giacchè la spora, rappresentando la *forma durevole* del microrganismo, ed essendo dotata di una resistenza vitale assai maggiore delle forme vegetative ordinarie, serve appunto al mantenimento della specie. È poi specialmente importante la sporificazione dal lato pratico, giacchè la resistenza maggiore che questi organi di riproduzione offrono verso gli agenti fisici (caldo e freddo, umidità e disseccamento) e verso certe sostanze chimiche (disinfettanti) esercita un gran peso sul problema della disinfezione. Se si tratta infatti di batterì sporigeni, occorrono per distruggerli gradi maggiori di concentrazione delle soluzioni chimiche, oppure gradi di temperatura assai più elevati, di quelli necessari ad uccidere batterì non sporigeni.

Specialmente interessante per l'igiene è quindi di conoscere il grado di temperatura che serve ad uccidere le singole spore. A questo riguardo è da notare bensì che le differenze sono molto notevoli per le diverse specie di microrganismi, cosicchè non deve credersi che, se le spore di certi bacilli (del carbonchio e dell'edema maligno ad es.) possono sopportare impunemente persino 140° C. di calore secco, anche le spore degli altri microrganismi debbano essere altrettanto resistenti. È da por mente a ciò, perchè talora riesce abbastanza difficile determinare con esattezza se una data forma di microbi è sporigena o no; ed uno dei migliori criterì per decidere la quistione è quello appunto di determinare il suo grado di resistenza agli agenti distruttori, e specialmente al calore.

In tal caso è già sufficiente il determinare con sicurezza che nello stato, che si suppone sporigeno, quel dato microrganismo resiste a gradi di temperatura notevolmente più alti, che nello stato di vegetazione semplice, anche se il limite massimo di temperatura a cui resiste non è estremamente elevato.

In generale le spore resistono di più al calore secco che a quello umido, e di questo fatto si trae partito nella pratica delle disinfezioni, adoperando appunto di preferenza il calore umido (vapore d'acqua semplice, o sotto pressione) per distruggere i germi patogeni.

Un' altra caratteristica importante delle spore, dovuta egualmente alla compattezza della loro membrana, è quella di assumere i colori d'anilina molto più difficilmente, e di ritenerli poscia più tenacemente del protoplasma cellulare; si può quindi con appositi metodi ottenere una colorazione diversa delle spore e dei bacilli (colorazione doppia), che serve bene a porle in evidenza, anche nello stadio iniziale della loro formazione.

Riassumendo, l'aspetto di corpuscoli, ovoidei o rotondi, fortemente rifrangenti, nell'interno della cellula batterica allo stato na-

turale, la possibilità di colorarli in maniera diversa dal protoplasma cellulare e la maggiore loro resistenza agli agenti chimici e fisici distruttivi, specialmente al calore, sono i criterî più importanti e più sicuri per acquistare la certezza dell'esistenza delle spore.

Le spore, poste in condizioni favorevoli di nutrizione e di temperatura, germogliano e riproducono la forma del microrganismo primitivo. Per lo più ciò non avviene se non dopo un certo stadio di riposo, e in un substrato materiale diverso da quello ove le spore stesse si sono formate. Non si conoscono ancora esattamente tutte le condizioni della germinazione; si può dire tuttavia che condizioni indispensabili sono una certa quantità di contenuto di acqua ed un grado di temperatura, oscillante entro limiti non molto estesi. Quanto all'ossigeno, la sua presenza è necessaria per la germinazione della maggior parte delle spore, mentre è invece d'ostacolo allo schiudersi di alcune, ad esempio di quelle del « bacillus butyricus ».

Quando la spora germoglia, perde la sua forte rifrangenza, si fa pallida e si allunga (Koch), assumendo a poco a poco la forma di bastoncino, finchè la membrana si rompe e il nuovo bacillo diviene libero. In altri casi invece (Brefeld, Prazmowsky) si forma ai poli o all'equatore della spora una specie di bottone, ed in questo punto, rompendosi la membrana, viene fuori il contenuto protoplasmatico, che si allunga a grado a grado fino a riprodurre la forma primitiva del microrganismo.

6. Nutrizione.

La nutrizione di questi esseri si fa a spese delle sostanze organiche già composte, sieno queste semplicemente idrocarbonate, oppure azotate (albuminoidi), a condizione però che sieno *solubili nell'acqua e si trovino in soluzione non troppo concentrata.* Sono necessarie inoltre alla loro nutrizione anche le sostanze minerali, e specialmente lo zolfo, il fosforo, il potassio (o rubidio o cesio) ed il calcio (o magnesio o bario).

L'acido carbonico viene loro fornito dagli idrati di carbonio solubili nell'acqua: di questi più specialmente appropriati sono, secondo Nägeli, le varie specie di zucchero, la mannite e la glicerina; vengono in seconda linea i diversi composti degli acidi grassi e le combinazioni alcaline dell'acido tartrico, citrico, malico, lattico, acetico, ecc. L'acido carbonico libero non possono assimilarlo, perchè la maggior parte di essi mancano, come si è detto, di clorofilla.

L'azoto libero non viene assimilato dai microrganismi; ma questi lo prendono dalle sostanze albuminoidi, e specialmente da quelle appartenenti al gruppo delle amine e delle amidi (acetamide, propilamina, metilamina, asparagina, leucina), e dai sali di ammonio. Gli albuminati devono essere in forma diffusibile, e vengono perciò spesso cangiati in peptone per opera di fermenti prodotti dagli stessi microrganismi. L'azione loro peptonizzante è assai energica, quando le soluzioni sono neutre o alcaline. Le sostanze azotate più adatte alla loro nutrizione sono, in iscala decrescente, l'albumina (peptone) e zucchero, la leucina e zucchero, il tartaro d'ammonio e zucchero, l'albumina (peptone) sola, la leucina, il tartrato d'ammonio e l'asparagina.

Lo zolfo è, secondo Nägeli, indispensabile per la nutrizione di tali esseri, e viene loro fornito dai varî sali dell'acido solforico e solforoso. Le altre sostanze minerali sono tolte dai relativi composti salini.

Aggiungiamo infine che è necessario, per la grande maggioranza dei batterî, che il mezzo di nutrizione abbia reazione leggermente alcalina, o per lo meno neutra; giacchè sono pochi quelli che sono capaci di svilupparsi bene anche in mezzi di reazione acida.

Nel mondo esterno i microrganismi trovano quindi facilmente le condizioni di nutrizione necessarie pel loro sviluppo. Una parte di essi crescono e si sviluppano soltanto sulle sostanze organiche morte, mentre altri possono vivere e svilupparsi a spese dell'organismo animale vivente, e questi sono i patogeni, o parassiti, dei quali appunto si tratterà qui in modo particolare

Non tutte le sostanze nutritive, ora accennate, sono egualmente adatte per la nutrizione di tutti i microrganismi; chè anzi molti di questi mostrano una speciale predilezione per l'una o per l'altra di dette sostanze. Lo stesso dicasi del rapporto quantitativo che esse debbono avere nelle miscele nutritive, il quale può variare assai per le diverse specie di microrganismi. In maniera generale si può dire soltanto che il contenuto di acqua dev'essere grande, e poca invece la concentrazione del mezzo nutritivo. I limiti entro cui può oscillare il contenuto di acqua non sono bene precisati, ma devono essere abbastanza ampî, dal momento che i microbi vegetano bene tanto in soluzioni piuttosto concentrate (15-20 % di sostanza solida), come in quelle che non contengono che traccie di materiali disciolti. Quando però il contenuto di acqua si abbassa al di sotto di un certo limite, lo sviluppo dei microrganismi si arresta: su questo fatto è basata l'azione conservatrice delle sostanze organiche, operata dai composti salini, avidi di acqua.

Nell'acqua che sia priva di qualunque sostanza disciolta i microbi muoiono presto; le spore invece si mantengono molto più a lungo. L'essiccamento li uccide egualmente in un lasso di tempo, che varia per ciascuna specie.

Quanto all'ossigeno, questo gas ha rapporti molto diversi colle

varie specie di microbi. È nota a questo riguardo la prima divisione che ne ha fatto Pasteur in *aerobî* od *aerofiti*, ed *anaerobî* od *anaerofiti*, basandosi appunto sul modo loro di comportarsi verso l'ossigeno; giacchè, mentre per lo sviluppo della maggior parte di essi è assolutamente necessaria la presenza dell'ossigeno libero (aerobî), alcuni invece, dove esiste questo gaz, non si sviluppano (anaerobî).

Osservazioni posteriori hanno però dimostrato che non esiste realmente una divisione assoluta, nel senso ammesso prima da Pasteur, ma che si possono invece, da questo punto di vista, distinguere tre categorie di microrganismi.

La prima è quella degli *anaerobî assoluti*, dei quali non è possibile alcuna manifestazione vitale, se non lungi dall'O. Di questi taluni sono produttori di fermentazione, ed altri invece si sviluppano anche senza che tal fenomeno si produca. Ve ne ha di quelli che non solo non vegetano in presenza dell'O., ma, se vi restano lungamente a contatto, muoiono persino. A questa classe appartengono pure alcuni patogeni, quali, ad es., il bacillo dell'edema maligno, quello del tetano e quello del carbonchio sintomatico. Le condizioni necessarie alla loro vita nel mondo esterno vengono loro procurate dalla presenza di altri microrganismi, i quali consumano l'O. e producono così un ambiente privo di questo gaz.

Il secondo gruppo è quello degli *anaerobî* (od aerobî) *facoltativi;* i quali, cioè, vegetano bene in un mezzo ricco di ossigeno, ma sono anche capaci di svilupparsi in un'atmosfera povera di O. ed anche là dove evvi mancanza assoluta di questo gaz.

Appartengono a questa categoria la maggior parte dei microrganismi patogeni.

A nessuno può sfuggire l'importanza di questo fatto, messo in chiaro la prima volta da Liborius (1); giacchè esso ci spiega come alcuni germi patogeni, ad es. il bacillo del tifo e il vibrione colerigeno, possono benissimo svilupparsi nel nostro intestino, dove l'O. è pochissimo o manca del tutto, e come anche altri (B. del carbonchio) possono svilupparsi nel sangue, dove O. libero non esiste.

Finalmente il terzo gruppo è costituito dagli *aerobî assoluti:* questi non sono suscettibili di alcuno sviluppo, se manca loro l'ossigeno, e sono sensibili persino a gradi leggeri di deficienza di tale gaz. Gli aerobî assoluti sono in numero grandissimo e comprendono specialmente i microrganismi delle acque e le specie cromogene, per le quali l'O. è necessario anche per la formazione della sostanza colorante.

(1) Liborius, *Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bakterien*, Zeitschrift f. Hygiene Bd. I Heft 1, 1886.

7. Azione dei microrganismi sui mezzi di nutrizione. Loro prodotti.

Basta esaminare semplicemente la reazione del mezzo nutritivo, nel quale si è fatto sviluppare artificialmente un qualche microrganismo, per vedere che in alcuni casi la reazione da neutra o debolmente alcalina, come d'ordinario si prepara, si è fatta alcalina od acida, o maggiormente alcalina; indizio questo di modificazioni che ha subìto il mezzo, per opera dello sviluppo dei microrganismi coltivati.

L'azione di questi sui mezzi nutritivi varia assai ne' suoi effetti, secondo la specie batterica, secondo le condizioni esterne (temperatura, presenza di ossigeno, ecc.) e secondo la composizione del substrato nutritivo; essa si riferisce sia al consumo del materiale di nutrizione, sia alla formazione dei prodotti del ricambio organico, il cui studio costituisce una parte molto importante dell'odierna batteriologia.

Di questi prodotti alcuni sono comuni alla maggior parte dei batterî, ed altri invece si possono dire specifici di ciascuna specie di essi. Fra i prodotti più comuni annoverasi l'anidride carbonica, l'ammoniaca, l'idrogeno semplice e solforato, alcuni acidi grassi, volatili (propionico, butirrico) o fissi (tartarico, ossalico, lattico, succinico), alcune amidi di questi acidi (leucina), alcuni corpi aromatici (fenolo, cresolo, indolo), ecc. Fra i prodotti speciali di alcuni batterî ricordiamo le sostanze coloranti (rossa, gialla, verde, turchina), i prodotti delle varie fermentazioni (alcool etilico, acido lattico, acetico, ecc.), i fermenti organici e certe sostanze tossiche (ptomaine, tossine, tossalbumine), prodotte specialmente da' quei batterî, che sono capaci di svilupparsi nell'organismo animale vivente.

A seconda di queste diverse loro proprietà, noi distinguiamo infatti alcuni batterî *cromogeni* (produttori di sostanze coloranti), altri *fotogeni* (produttori di luce), altri fattori dei processi di fermentazione o di decomposizione delle sostanze organizzate, prive di vita (putrefazione), ed altri infine *patogeni* o *parassitarî*, i quali vivono e si sviluppano a spese di un organismo vivente.

Per quanto a noi interessino specialmente questi ultimi soltanto, è bene però accennare qualche cosa anche degli altri, per l'interesse biologico generale che essi offrono e per le molte proprietà che hanno in comune tutti quanti.

Quanto ai microrganismi così detti *cromogeni*, diciamo anzitutto che la formazione di pigmento si osserva per lo più nelle

specie non patogene, ma talora anche in alcune di quelle parassitarie, e dipende anzitutto dalla composizione del mezzo di nutrizione. Così ad es. il bacillo della morva e il vibrione colerigeno producono una materia colorante bruna, soltanto sulle patate; ed il bacillo del latte azzurro nella gelatina cresce con questo colore, mentre nelle soluzioni gommose, dove si sviluppa bene egualmente, non produce alcuna sostanza colorante.

Questi fatti parlano in favore dell'opinione, che la formazione del pigmento abbia luogo di preferenza nel substrato nutritivo, e che i batterî producano una specie di *sostanza cromogena*, che si colora in presenza dell'ossigeno atmosferico. Basta infatti impedire il libero afflusso di questo gaz, anche ricoprendo semplicemente la coltura con uno strato di olio, per impedire la formazione del pigmento, per quanto continui lo sviluppo del microrganismo.

Anche la temperatura può avere una notevole influenza sulla produzione del pigmento. È interessante al riguardo l'osservazione fatta da Schottelius (1), che, facendo sviluppare le colture di micrococco prodigioso sulle patate alla temperatura di 38-39° C., si ottengono colonie prive di pigmento, mentre, facendole sviluppare di nuovo a temperatura più bassa, si riottengono le colonie solite colorate in rosso.

La luce invece non sembra avere influenza sulla produzione del pigmento. Culture di micrococco prodigioso, fatte sviluppare e conservate nell'oscurità, si mostrano altrettanto colorite di quelle tenute alla luce.

In generale si può dire che tutte le condizioni, le quali diminuiscono l'attività di sviluppo dei batterî cromogeni, ne diminuiscono pure la proprietà di formare la sostanza colorante.

È pure interessante la proprietà che hanno alcuni batterî di essere *fotogeni* o *fosforescenti*.

Il curioso fenomeno della fosforescenza, oltre che in molti esseri viventi, animali e vegetali, si osserva spesso nei pesci di mare, morti, nel legno morto, nella carne e sopratutto, in certe regioni, nelle acque del mare.

Dopo Pflüger (2), che nel 1875 osservò per primo nel muco luminoso che copriva la testa di un merluzzo la presenza di miriadi di batterî, e dopo Cohn (3), il quale studiò più esattamente

(1) Schottelius, *Biologische Untersuchungen ü. d. Mikrokokkus prodigiosus*, Leipzig, 1887, Separatabdr. aus: Festschrift f. Kölliker.

(2) Pflüger, *Ueber die Phosphorescenz verwesender Organismen*. Archiv f. d. gesammte Physiologie, XI, 1875 p. 222-263.

(3) Cohn, *Kryptogamenflora von Schlesien*, Cohn's Beiträge, ecc. Bd. III. p. 143.

nel 1878 gli stessi microrganismi (*Micrococcus phosphorescens*), le osservazioni sui batterî produttori di luce si sono rapidamente moltiplicate. Così si è trovato che la fosforescenza della carne di pesce di mare conservata (Bancel e Husson (1)), quella delle carni conservate nei macelli (Nüesch (2)) e di altre specie di carni e di pesci di mare freschi (Lassar (3), Ludwig (4)) e conservati (Forster e Tilanus (5)), nonchè la fosforescenza delle acque del mare (Fischer (6), Hermes (7)), sono il prodotto di speciali microrganismi (8).

Tutti questi batterî fotogeni hanno in comune la proprietà di non esser luminosi, se non nei mezzi che contengono una certa quantità di sal di cucina (2 a 4 %) ed in presenza dell'ossigeno atmosferico. Basta la deficienza dell'ossigeno libero, oppure l'insorgere della putrefazione (nelle carni) per togliere loro il potere fotogeno. Invece la luce solare non sembra avere alcuna influenza su tale proprietà; infatti le culture di tali microrganismi, lasciate all'oscuro o tenute alla luce, lucono sempre egualmente.

Se i microrganismi fotogeni si diluiscono nella gelatina fluida (a 25° C.), e questa si fa poi solidificare, distesa su lastre di vetro, le colonie che si sviluppano offrono, osservate nell'oscurità, un aspetto bellissimo, come di cielo gremito di stelle; e la luce che ne emana è sufficiente per fare impressione su di una lastra sensibile fotografica, sulla quale si ritrae perfettamente l'immagine della loro parvenza.

La fosforescenza del legno nelle foreste non è dovuta a batterî, ma sibbene ai miceli di funghi più elevati, Basidiomiceti ed Ascomiceti (*Agaricus melleus*, *Xillaria hypoxylon*, ecc.). Quella invece dei legni che stanno nel mare è dovuta ai batterî sopra menzionati.

(1) Bancel et Husson, *Sur la phosphorescence de la viande de hommard.* Comptes rendus de l'Acad. des Sciences, 1879, p. 191.

(2) Nüesch, *Ueber leuchtende Bacterien*, Bâle 1885 e Gaea 1887, N. 9.

(3) Lassar, *Die Mikrokokken der Phosphorescenz.* Pflüger's Archiv f. d. gesammte Physiologie, Bd. XXI. 1880.

(4) Ludwig, *Micrococcus Pflügeri.* Botanische Centralblatt, XVIII, N. 11, e *Die bisherigen Untersuchungen über leuchtende Bacterien.* Centralblatt f. Bacteriologie u. Parasitenkunde, Bd. II, 1887, N. 13-14.

(5) Forster, *Ueber einige Eigenschaften leuchtender Bacterien.* Centralblatt f. Bacteriologie u. Parasitenkunde, Bd. II, 1887. N. 12.

(6) Fischer, *Bacteriologische Untersuchungen auf einer Reise nach Westindien.* II. *Ueber einen lichtentwickelnden in Meerwasser gefundenen Spaltpilz*, Zeitschrift f. Hygiene, Bd. II. 1887, p. 54, e Centralblatt f. Bacteriologie IV, Bd. 1888 p. 89.

(7) Hermes, *Demonstration des leuchtenden Nordsee-Bacillus*, Tageblatt d. 60 Versammlung Deutscher Naturf. u. Aerzte in Wiesbaden, 1887, p. 254.

(8) La fosforescenza delle acque del mare può bensì riconoscere per causa anche la presenza di infusorî, quali la *noctiluca*, ecc.

Non è ancora bene determinato se il fenomeno della fosforescenza sia dovuto ad una sostanza fotogenica, prodotta dai microrganismi nel mezzo di nutrizione, o se invece debba considerarsi come un fenomeno vitale, intracellulare, che accompagna lo scambio materiale della cellula batterica.

Altri batterî, dal nostro punto di vista più interessanti, determinano alterazioni speciali del mezzo in cui si sviluppano, caratterizzate da decomposizione e da consumo dei materiali nutritivi, con abbondante formazione di speciali prodotti. Queste alterazioni, che si accompagnano per lo più con sviluppo di gaz, vanno col nome di *fermentazione*, o di putrefazione, designando colla prima denominazione quei casi in cui si hanno prodotti utili, e colla seconda, invece, il caso speciale di decomposizione rapida delle sostanze organiche e specialmente degli albuminoidi.

Le varie specie di fermentazione sono provocate da microrganismi diversi. Di questi alcuni abbisognano dell'O. libero, come sarebbe il batterio della fermentazione acetica, che trasforma l'alcool in acido acetico; per altri invece l'O non è necessario, oppure è addirittura nocivo, come accade per l'agente della fermentazione butirrica.

È specialmente nei microrganismi delle fermentazioni che si manifesta il fatto dell'influenza nociva che esercitano i prodotti dello scambio materiale sull'ulteriore loro sviluppo. Così nella fermentazione lattica basta un quantitativo di acido lattico del 0,8 % per arrestare il processo di fermentazione: nella fermentazione alcoolica i saccaromiceti specifici sospendono la loro azione, allorquando l'alcool ha raggiunto il limite di 14 % circa.

È allo stesso fatto che, con ogni probabilità, si deve la morte che avviene di certi batterî nelle culture, molto tempo prima che sia consumato tutto il materiale di nutrizione.

Ricordiamo inoltre che i prodotti dello scambio materiale di alcuni batterî impediscono lo sviluppo di altri, esercitando su questi un'azione velenosa. Di questo fatto, noto colla denominazione di *concorrenza vitale*, si è cercato di trar profitto, finora però con poco successo, per la cura di certe malattie da infezione (Batterioterapia).

Nella *putrefazione* il materiale fermentante è specialmente costituito da sostanze albuminoidi, le quali, prima di decomporsi, vengono trasformate in peptone da un fermento chimico speciale.

Le specie di microrganismi, capaci di dar origine a questo fenomeno, sono molteplici, e finora non è stata esattamente determinata la parte che spetta a ciascuna di esse nel processo della putrefazione. Si sa solamente che i prodotti sono svariatissimi e che di quei batterî taluni sono aerobî ed altri anaerobî.

La fermentazione putrida avviene perciò in maniera molto diversa, come ha per primo dimostrato Pasteur, a seconda che av-

viene a contatto dell'aria o lungi da questa. Nella putrefazione ordinaria bensì, che avviene in presenza dell'ossigeno atmosferico (canali neri, latrine, ecc.), l'inizio del processo è dovuto ai microrganismi aerobî; questi consumano tutto l'ossigeno contenuto nella massa fermentescibile e poscia la abbandonano, a poco a poco, radunandosi sulla superficie sotto forma di pellicola (micoderma), più o meno spessa. In tal guisa si realizzano gradatamente le condizioni favorevoli allo sviluppo degli anaerobî, sia perchè la pellicola formatasi alla superficie impedisce l'ingresso dell'ossigeno, come anche perchè si ha lo sviluppo di altri gas nella massa che fermenta.

In questa seconda fase cambiano assai i prodotti della decomposizione. Mentre dapprincipio la presenza dell'ossigeno determinava un' ossidazione completa delle sostanze organiche, riducendole in composti semplici e inodori (CO^2 e H^2O), per opera dei batterî anaerobi, invece, ha luogo lo sviluppo di gaz fetenti (idrogeno solforato, ammoniache composte, acidi grassi volatili) e di sostanze d'odore fecaloide e ributtante, come l'indolo e lo scatolo.

Un altro fatto importante si è che, nel secondo periodo della fermentazione putrida può aver luogo, a lato dei batterî anaerobî putrefacienti, lo sviluppo di alcuni anaerobî patogeni, come è il bacillo del tetano e quello dell'edema maligno, capaci di formare spore. Questo ci spiega come in certi terreni sia così frequente la presenza di tali germi.

Ai processi di putrefazione vanno uniti quelli così detti di *nitrificazione,* che si compiono nel terreno per opera di speciali microrganismi, e danno luogo alla decomposizione dei materiali organici in quello contenuti, preparando così il materiale nutritizio necessario per lo sviluppo dei vegetali. Questi fenomeni sono molto importanti, anche pel fatto della depurazione che possono in virtù di essi subire nel terreno le acque immonde (acque cloacali, ecc.).

Alcuni batterî sono poi capaci di produrre *fermenti chimici* isolabili, che servono per la loro nutrizione, come servono per gli animali superiori i fermenti secreti nel tubo digerente; giacchè, anche per i batterî, è necessario che le sostanze nutritive subiscano quelle modificazioni che le rendono atte ad essere assimilate.

Finora si è riuscito ad isolare sicuramente soltanto pochi di codesti fermenti. Wortmann (1) ha isolato dalla cultura di una miscela di batterî, ottenuti dalla putrefazione delle fave e delle patate, un fermento solubile capace di trasformare l'amido in zucchero. Duclaux (2) ha ottenuto da alcuni batterî della fermen-

(1) Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. VI.
(2) Duclaux, *Le Lait*, Paris, 1887.

tazione del latte una sostanza diastasica speciale, la caseasi, capace di peptonizzare e disciogliere la caseina nel latte coagulato. La liquefazione della gelatina nutritiva di Koch per opera dello sviluppo di certi microrganismi è dovuta ad un fermento analogo, che è stato isolato la prima volta da Rietsch (1), il quale ha pure dimostrato che quel fermento manca in tutte le specie non liquefacienti.

Si attribuisce pure all'azione di fermenti chimici la trasformazione dello zucchero di canna e dello zucchero di latte in glucosio e levulosio e in galattosio, operata da certi microrganismi. Lo stesso dicasi della coagulazione della caseina del latte, della trasformazione dell'urea in carbonato d'ammonio e di quella dell'acido ippurico in glicocolla ed acido benzoico nell'urina fermentata. I relativi fermenti però non sono ancora stati isolati in maniera sicura.

Il modo d'agire di tali fermenti non è ancora bene determinato. Si può dire soltanto, in maniera affatto generale, che la sostanza che si decompone si idrata, e che ciascuna molecola della stessa, combinandosi con una o con più molecole d'acqua, si scinde in altrettante nuove molecole.

Quanto alle condizioni che favoriscono l'azione di questi fermenti, si sa soltanto che una temperatura piuttosto elevata (60° C.) e un leggero grado di reazione acida sono favorevoli allo sviluppo della loro azione. Certo è che siffatti fenomeni hanno nulla di comune con quelli delle fermentazioni propriamente dette, le quali sono dovute allo sviluppo ed alla vita dei microrganismi. E difatti le condizioni esterne, sovraccennate, favorevoli all'azione dei fermenti chimici, sono assolutamente contrarie alla produzione delle vere fermentazioni.

Ma lo scambio materiale di certi microbi dà luogo ad altri prodotti, che sono i più importanti per noi e che esercitano un'azione tossica sulla cellula vivente. Di questi prodotti alcuni sono basi azotate, assai vicine agli alcaloidi vegetali, sia per le reazioni chimiche, come per l'azione loro fisiologica, e sono note col nome generico di *Ptomaine* o *veleni cadaverici* (*Ptoma*, cadavere), perchè le prime furono ricavate dalle carni in putrefazione.

Nella storia della scoperta degli alcaloidi della putrefazione citiamo principalmente il nome di Panum (2), il quale per primo isolò da sostanze putrefatte un veleno, solubile nell'acqua, che iniettato negli

(1) Rietsch, *Ferments des Bacteries*. Journal de pharmacie et de chimie, Juillet 1887.

(2) Panum, *Das putride Gift*, ecc. Virchow's Archiv. Bd. 40, p. 301.

animali li uccideva coi sintomi della setticemia umana; quelli di Bergmann e Schmiedeberg (1), i quali estrassero un veleno analogo, la sepsina, dal lievito di birra putrefatto e dal sangue; quello di Nencki (2), il quale per primo riuscì ad ottenere un alcaloide della putrefazione allo stato di purezza; quelli di Gauthier e di Selmi (3), i quali isolarono diverse basi tossiche dalle carni in putrefazione; quelli di Mosso e Guareschi (4), i quali estrassero una sostanza di azione analoga al curaro dalla fibrina di bue putrefatta; e quello di Maas (5), il quale isolò dalla carne muscolare e dalla sostanza cerebrale putrefatta alcuni alcaloidi cristallini, di azione analoga a quella del curaro, della stricnina e della morfina.

I lavori più importanti fatti sull'argomento sono però quelli di Brieger (6), il quale, mediante un nuovo metodo d'estrazione, riuscì ad ottenere isolate molte di queste basi azotate, sia dalle carni putrefatte, come anche dalle culture pure di alcuni microrganismi patogeni.

Alcune di tali sostanze non hanno veruna azione sull'organismo animale, oppure vi producono effetti patologici leggeri e di poca durata, e per queste Brieger riserba il nome primitivo di « ptomaine » : altre invece sono capaci di azioni tossiche gravissime, tali da produrre la morte degli animali, anche a minime dosi, del pari che i più attivi veleni vegetali (morfina, muscarina). A queste ultime Brieger ha applicato il nome speciale di « tossine ».

Fra gli alcaloidi ottenuti dalle sostanze in putrefazione, i quali sono innocui, oppure solamente nocivi a dosi molto forti (ptomaine), citiamo: 1.° la *cadaverina*, che si trova nei cadaveri umani in putrefazione dal 4.° giorno in su; 2.° la *putrescina*, avente la stessa origine della precedente; 3.° la *saprina*, che è un altro alcaloide dei cadaveri umani, analogo alla cadaverina; 4.° la *neuridina*, che è una delle basi più comuni. Si trova nella carne, nel formaggio e specialmente nella colla in putrefazione; nei cadaveri umani si trova dopo il 3.° giorno. Oltre a queste principali, se ne trovano poi in varie circostanze molte altre, quali la metilamina, la dimetilamina, la trimetilamina e via dicendo.

Fra le tossine della putrefazione citiamo: 1.° La *peptotossina*, che si forma

(1) Bergmann e Schmiedeberg, *Centralbl. für die med. Wissensch.* 1868. N. 32.

(2) Nencki, *Ueber die Zersetzung der Gelatine und des Eiweisses*, ecc. Bern 1876.

(3) Selmi, *Sulle ptomaine od alcaloidi cadaverici*, ecc. Bologna 1878.

(4) Mosso e Guareschi, *Arch. ital. de Biol.* t. II e III.

(5) Maas, *Ueber Fäulniss-Alkaloide*. Fortschritte der Medicin, 1883.

(6) Brieger, *Ueber Ptomaine*, e *Untersuchungen über Ptomaine* I, II, III Theil, Berlin 1885, 1886 e 1887. Virchow's Archiv Bd. 115, 1889, pag. 483.

specialmente nella digestione della fibrina per azione del succo gastrico artificiale, e che probabilmente si forma anche per l'azione peptonizzante di certi batterî; 2.° la *mïdatossina*, estratta da Brieger dai cadaveri umani putrefatti; 3.° la *muscarina*, trovata dallo stesso nella carne di pesce putrefatta: 4.° la *gadinina*, isolata pure da Brieger, prima dai pesci putrefatti e più tardi dalla gelatina putrefatta per opera dei batterî delle feci. È interessante il fatto, che questo alcaloide produce nei topi e nelle cavie fenomeni di paralisi acuta progressiva, simili appunto a quelli che si hanno nell'uomo per avvelenamento da pesci corrotti; 5.° la *neurina* che si trova nelle carni in putrefazione in 5.ª o 6.ª giornata. È una delle più velenose, ed è eguale alla neurina che si trova normalmente nella sostanza cerebrale; 6.° la *tirotossina*, trovata da Vaughan (1) dapprima nel formaggio putrefatto e poscia nel latte alterato col fermento dell'acido butirrico. Egli crede che a questa sostanza sieno dovuti i fenomeni del coléra infantile; 7.° la *metilguanidina*, estratta dalla carne putrefatta; 8.° la *muscarina*, estratta dal merluzzo putrefatto; 9.° la *mitilotossina*, estratta dal mitile velenoso; 10.° la *midaleina*, isolata dai cadaveri umani. Queste ultime quattro furono tutte isolate e studiate da Brieger.

8.° La tardi[illegible] estratta dalle putrefatte

Le nozioni sulle basi tossiche della putrefazione hanno un'importanza pratica notevole, perchè coll'azione di queste sostanze si spiegano i fenomeni di avvelenamento per formaggi e carni putrefatte (pesci, molluschi, salsiccie, ecc.), come anche alcuni disturbi delle cattive digestioni. Tali sostanze inoltre si formano nelle carni nell'inizio della loro decomposizione, prima che si abbia la vera putrefazione, accompagnata da sviluppo di gaz odorosi; cosicchè è facile che vengano ingerite, non potendo chi le mangia venire avvertito dal cattivo odore che si è iniziata la decomposizione.

Ma la parte più importante dei lavori di Brieger è quella relativa all'isolamento delle basi tossiche dalle culture pure di alcuni batterî patogeni; giacchè un tal fatto ha aperto la strada alla soluzione di due problemi importantissimi, quali sono quello del modo d'agire dei batterî patogeni e l'altro della produzione dell'immunità acquisita.

Appena scoperta l'esistenza di queste basi tossiche nelle culture di microrganismi patogeni, si credette infatti di potere con esse spiegare l'azione nociva che questi esercitano nell'organismo animale, nel quale si sviluppano. Ben presto però si riconobbe che, sperimentando negli animali coll'iniezione delle tossine batteriche, si riproduce in questi soltanto una parte e non tutti i fenomeni patologici proprî delle rispettive infezioni.

Ricerche ulteriori di Brieger e Fränkel (2) hanno infatti

(1) Vaughan, *Ueber die Anwesenheit von Tyrotoxin im giftigem Eis und giftiger Milch, und seine warscheinliche Beziehung zur Cholera Infantum*, Archiv. f Hygiène Bd. VII, 1887, Heft 4.

(2) Brieger e Fränkel, *Untersuchungen über Bacteriengifte*. Berl. klin. Wochenschr. N. 11 e 12. 1890.

dimostrato che nelle culture dei batterî, fatte in certi mezzi di nutrizione, fortemente albuminosi, come anche nei tessuti degli animali infetti si riscontrano pure altre sostanze nocive, che non hanno le reazioni degli alcaloidi, come le tossine, ma sono invece corpi di natura albuminoide, detti perciò *tossi albumine*, i quali provengono da una trasformazione diretta della molecola albuminoide per opera dei batterî. Tali sostanze sono state finora dimostrate nelle culture del bacillo difterico, di quello del tifo, del tetano e del colera, nelle culture dello stafilococco aureo e negli estratti acquosi degli organi di animali, morti per infezione carbonchiosa.

Nè qui si arresta la serie delle sostanze velenose, che possono produrre i batterî nel loro sviluppo; giacchè, secondo ricerche posteriori, nelle culture del bacillo difterico (Roux e Jersin), come in quelle del bacillo del tetano (Tizzoni) si trova un altro genere di sostanze nocive, che non appartiene nè alle tossine, nè alle tossi albumine, ma che ha piuttosto le proprietà dei fermenti organici.

Lo studio, adunque, dei prodotti solubili, nocivi, dei batterî patogeni è finora tutt'altro che completo; e ciò, in causa delle gravi difficoltà che si incontrano nelle ricerche di quei prodotti, difficoltà che sono inerenti in parte al fatto che essi non si producono in tutti i mezzi di nutrizione, ma soltanto in quelli aventi una composizione conveniente, ed in parte anche a ciò che spesso se ne formano parecchi contemporaneamente, e di natura diversa, e si fa così tanto più difficile il loro isolamento.

Aggiungiamo infine che non è dimostrato che i così detti prodotti dello scambio materiale sieno i soli rappresentanti dell'attività patogena dei batterî; chè anzi, dalle ricerche di Buchner, di Prudden e di altri sembra risultare che le sostanze più energicamente attive sono contenute nel protoplasma degli stessi batterî (*proteine batteriche* di Buchner), anzichè nel mezzo in cui essi si sviluppano.

8. Azione patogenica.

Il gruppo più interessante, per la medicina e per l'igiene, è quello dei batterî, che sono capaci di svilupparsi a spese dell'organismo animale vivente e di esercitarvi un'azione morbosa, costituendo in tal modo la causa di quella classe speciale di malattie, dette *infettive*, o da infezione. Essi sono chiamati perciò batterî *patogeni*, o *parassitarî* (*microparassiti*).

Fra i batterî parassitarî se ne distinguono alcuni, i quali sono detti parassiti *assoluti*, perchè in natura menano sempre una vita

parassitaria e non si moltiplicano nella materia organica morta, se non tutt'al più nei prodotti di secrezione dell'organismo animale (bacillo tubercolare negli sputi), oppure nelle condizioni artificiali dei nostri laboratorî. Altri invece, detti parassiti *facoltativi*, vivono d'ordinario come saprofiti nel mondo esterno e, solo accidentalmente, trovando nell'organismo vivente condizioni favorevoli pel loro sviluppo, vi si moltiplicano diventando parassiti. Tutti gli altri batterî, i quali non possono vivere che a spese della materia priva di vita, si designano per ciò col nome di *saprofiti*.

Noi manteniamo ancora una tale distinzione dei batterî in saprofiti e parassiti, per quanto siamo d'accordo con chi sostiene (Hueppe) che non havvi fra gli uni e gli altri alcuna differenza assoluta, giacchè vi sono anelli di congiunzione, o gradini di passaggio, fra l'una e l'altra di quelle categorie. Conosciamo infatti batterî altamente parassitarî, i quali non solo vivono e si sviluppano nel mondo esterno, ma possono anche, in certe condizioni di vita, perdere il loro potere patogeno (B. del carbonchio); mentre altri, i quali vivono d'ordinario come nostri commensali sulla superficie, esterna od interna, del corpo, possono in date condizioni produrre fenomeni morbosi. Ma ciò non toglie che vi sia pure un numero grandissimo di microrganismi, i quali sono sempre innocui e non si sviluppano che sulla sostanza organica morta.

La ragione del fatto, che soltanto i batterî parassitarî sono capaci di svilupparsi nell'organismo animale vivente, deve riporsi nella capacità che essi hanno di resistere nella lotta coi tessuti viventi; lotta in cui sono attivi sia gli elementi cellulari (Metschnikoff), sia i succhi dell'organismo e sia, più probabilmente, entrambi. Certo è che, se si diminuisce artificialmente il potere di resistenza dell'organismo, mediante l'azione di certi veleni, che possono anche essere elaborati dagli stessi microrganismi, si vedono talvolta moltiplicarsi nell'organismo, infettandolo, certi batterî che normalmente in esso non si sviluppano.

Sul meccanismo e sull'importanza biologica di questa lotta dell'organismo coi parassiti invasori si dirà più a lungo in seguito, nel parlare dell' immunità e del modo con cui si produce.

Riguardo ai microrganismi patogeni, noi dobbiamo studiare anzitutto le vie per le quali essi penetrano nel nostro organismo e la maniera colla quale si rendono a questo infesti.

In quanto alla porta d'ingresso del virus, le malattie infettive si sogliono dividere in 2 gruppi: il primo è di quelle in cui l'infezione penetra nell'organismo da una ferita, che è quanto dire da una lesione qualsiasi, grossolana, della superficie corporea (*Wundinfectionskrankheiten* dei tedeschi), e l'altro invece di quelle in cui l'infezione si sviluppa senza il concorso di alcuna lesione esterna, almeno apparente.

Nelle malattie del primo gruppo, in cui l'agente infettante penetra nell'organismo da una lesione di continuo, l'imagine clinica e ana-

tomo-patologica è diversa, secondo che il microparassita si diffonde soltanto nel tessuto circumambiente, oppure penetra invece nel torrente circolatorio sanguigno e va ad invadere territorî lontani e molteplici.

Si distingue per ciò un'azione *locale* ed un'azione *generale* dei microrganismi. Quanto alla prima, allorchè uno di questi esseri si insedia in un tessuto e vi si moltiplica, penetra negli interstizî fra cellula e cellula ed anche nell'interno della cellula stessa, la quale a poco a poco perde la sua vitalità e muore. Quest'alterazione nutritiva della cellula è in parte semplicemente meccanica, dovuta, cioè, alla moltiplicazione rapida dei batterî, ed in gran parte chimica, prodotta cioè dai veleni che si formano pel loro sviluppo. Da ciò la degenerazione dei tessuti, la necrosi consecutiva e l'irritazione dei tessuti circumambienti, con reazione infiammatoria essudativa e spesso emorragica. Non di rado questo processo reattivo è salutare, perchè si forma d'attorno uno strato denso di connettivo, che impedisce l'ulteriore diffondersi dei parassiti: spesso però questi penetrano a poco a poco nelle vie linfatiche, od anco in quelle sanguigne, ed emigrano in organi lontani a riprodurre, là dove si fermano, gli effetti di distruzione ora descritti.

Nelle malattie del secondo gruppo la penetrazione dell'agente patogeno può aver luogo da tutti i punti della superficie del nostro corpo, sia esterna (cute), come interna (mucose).

Attraverso la cute intatta i microrganismi patogeni possono penetrare difficilmente, in causa della struttura anatomica della pelle, la quale protegge i tessuti sottoposti con un rivestimento corneo, difficilmente permeabile. Vi sono però alcune vie, rappresentate dai follicoli dei peli e dai canali escretori delle ghiandole, che si aprono liberamente sulla superficie cutanea, attraverso alle quali possono introdursi i microrganismi. Difatti le ricerche sperimentali di Garré (1) e di Roth (2) hanno dimostrato positivamente che può aver luogo il passaggio di germi patogeni attraverso la cute intatta, producendo così l'infezione dell'organismo.

Lo stesso fatto si verifica, anche più facilmente, per le mucose. Attraverso la mucosa delle vie respiratorie, contrariamente all'opinione sostenuta da Wyssokowitsch, Buchner (3) ha di-

(1) Garré, *Zur Aetiologie acuteitriger Entzundungen*, Fortschr. d. Med. N. 6, 1885.

(2) Roth, *Ueber das Verhalten der Schleimhäute und der äusseren Haut in Bezug auf ihre Durchlässigkeit für Bacterien*, Zeitschrift f. Hygiene, I Heft, 1888.

(3) Buchner, *Untersuchungen über den Durchtritt von Infectionserregern durch die intacte Lungenoberfläche*, Archiv. f. Hygiene, 2 Heft, 1888.

mostrato la possibilità della penetrazione attraverso la mucosa intatta, anche di microrganismi relativamente voluminosi, come sono i bacilli del carbonchio. Egli ha pure trovato una ragione del risultato negativo ottenuto da altri sperimentatori in esperienze consimili; giacchè, se si introducono nel polmone grandi quantità di bacilli e si desta così una forte reazione infiammatoria del tessuto (polmonite), si ha difficilmente l'infezione generale, costituendo il tessuto infiammato una barriera alla penetrazione dell'agente infettivo.

Per quanto sia sperimentalmente provata la possibilità di un'infezione attraverso la mucosa intatta delle vie respiratorie, siamo però ben lungi dall'ammettere con Pettenkoffer che il polmone rappresenti la porta d'ingresso più comune dei germi patogeni, e che da qui sieno trasportati per mezzo del sangue negli organi dove si localizzano le diverse malattie infettive.

Non si può infatti istituire un parallelo fra le condizioni dello esperimento negli animali, ai quali si fa respirare l'aria *satura di germi altamente infettivi*, e quelle in cui si trova l'uomo ordinariamente; sia perchè nell'aria che si respira i germi si trovano sempre molto diluiti, sia perchè in gran parte si depositano sulle prime vie d'ingresso (naso e bocca), e sia finalmente perchè spesso nell'aria i germi patogeni si trovano attenuati, più o meno, per opera del disseccamento e della luce solare.

Più facilmente possono i microparassiti penetrare per la via degli organi digerenti; giacchè una gran parte di essi può penetrarvi per mezzo dei cibi e delle bevande, e la stessa mucosa che riveste quegli organi, essendo normalmente destinata all'assorbimento, offre già condizioni propizie all'introduzione dei batterî.

Si credeva prima che il succo gastrico acido uccidesse i microrganismi, o per lo meno le forme loro vegetative. Ricerche più esatte hanno invece dimostrato che lo stesso succo gastrico del cane, che è fortemente acido, non uccide sicuramente i vibrioni del colera e i bacilli del carbonchio e lascia passare assolutamente inalterati i bacilli della tubercolosi (Zagari) e quelli del tetano (Sormani). Tutt'al più può aversi nello stomaco un arresto di sviluppo dei batterî introdotti, ma questi, specialmente poi se sporigeni, passando nell'intestino e trovando quivi, in un mezzo neutro o debolmente alcalino, condizioni favorevoli al loro sviluppo, possono moltiplicarsi rapidamente e dar luogo all'infezione. Per questa via penetrano infatti nel nostro organismo i bacilli del tifo e quelli del colèra.

Finalmente anche la mucosa degli organi genito-urinarî può costituire una porta d'ingresso pei microrganismi patogeni. Di questi alcuni, come quelli delle infezioni puerperali, penetrano attraverso lesioni di continuo, ed altri invece (della gonorrea e della sifilide)

penetrano, con ogni probabilità, senza che vi sieno alterazioni visibili del rivestimento epiteliale.

L'esperimento, adunque, ha positivamente dimostrato che attraverso il derma e alle mucose, intatti, possono penetrare nel nostro organismo germi infettivi; come del resto lo faceva supporre il modo di propagarsi di certe infezioni, per le quali non era possibile ammettere, in tutti i casi, la preesistenza di lesioni nel rivestimento cutaneo o mucoso. Oggidì possiamo anche fino ad un certo punto renderci ragione del fatto, che soltanto le forme parassitarie e non le altre possono per quelle vie penetrare nell'organismo; giacchè le prime, là dove si annidano, producono sostanze nocive per la vita degli elementi cellulari e si aprono così la strada per entrare nell'organismo.

In qual maniera possono i microparassiti spiegare nell'organismo un'azione nociva? In molti modi. Si può dire anzitutto che sono dannosi perchè consumano in parte quei materiali organici, specialmente albuminoidi, che sono destinati alla nutrizione dei tessuti, ed anche perchè consumano l'ossigeno del sangue; per quanto, a questo riguardo, le ricerche di Liborius abbiano dimostrato che la maggior parte dei patogeni sono anaerobi facoltativi, e non hanno quindi un bisogno assoluto di quel gaz.

In secondo luogo è pure da ammettersi che alcuni possono esercitare un'azione nociva pel solo fatto meccanico della loro enorme moltiplicazione nell'interno dell'organismo, e specialmente nei piccoli vasi sanguigni (microrganismi pioemici, bacilli del carbonchio).

Ma la causa principale del potere patogeno dei microrganismi dobbiamo ricercarla in quelle sostanze tossiche, che essi producono nel loro sviluppo, o che sono contenute nel protoplasma batterico, colle quali si è visto che possono riprodursi i principali, se non tutti i fenomeni morbosi di certe infezioni.

Non è a credersi che la proprietà di produrre sostanze nocive sia esclusiva dei microrganismi parassitarî, giacchè anche alcuni saprofiti producono nel loro sviluppo sostanze, le quali, introdotte nel nostro organismo, agiscono come veleni. Anche questi adunque possono riescire *patogeni*; ma la malattia che essi producono ha i caratteri di una semplice « intossicazione » e non quelli di una « infezione ». Essi infatti non hanno la proprietà di moltiplicarsi nell'interno dell'organismo e non entrano per nulla come parte attiva nel produrre i fenomeni morbosi, i quali sono dovuti esclusivamente ai loro prodotti velenosi. Si distinguono perciò coll'appellativo di patogeni « *tossici* », riserbandosi il nome di patogeni *infettanti* a quelli soltanto i quali sono capaci di *moltiplicarsi nell'interno dell'organismo animale, e di nutrirsi a spese della sostanza organica vivente.*

Oltre a ciò, alcuni microrganismi, che si trovano ordinariamente come commensali nel nostro intestino e che riescono innocui in condizioni normali, possono, moltiplicandosi eccessivamente, allorquando l'alterata digestione ne fornisce loro l'opportunità, riuscire anche mortali per le sostanze velenose che producono e che vengono assorbite dalla mucosa intestinale. Questo è appunto quanto si verifica in quelle malattie che vanno col nome di « diarrea estiva », o « colèra nostrano ».

In questi casi però, per quanto la moltiplicazione dei batterî abbia luogo nell'organismo, la loro nutrizione si fa a spese del contenuto intestinale e non a carico dei tessuti viventi.

Altre volte invece i fenomeni di intossicazione si hanno per l'introduzione di sostanze già alterate al difuori dell'organismo, per opera dello sviluppo di microbi tossici. Tale è il caso degli avvelenamenti per carne guasta, o per molluschi o pesci, non ben conservati.

In tutti questi casi riesce affatto indifferente che sieno introdotti nell'organismo i batterî coi loro prodotti, oppure questi ultimi soltanto, e la loro azione è sempre proporzionata alla quantità che se ne introduce. Altrimenti invece corre la bisogna pei patogeni infettanti, i quali agiscono anche se introdotti in poca quantità, e la azione loro si fa sempre più manifesta e più intensa col moltiplicarsi che fanno nell'interno dell'organismo vivente.

Quindi, per quanto anche nella vera infezione si abbiano in gran parte fenomeni di avvelenamento, per opera dei prodotti tossici dei batterî sviluppati nell'organismo, pure il quadro della malattia è essenzialmente diverso da quello dell'intossicazione, perchè nella prima entra in giuoco l'attività vitale dei batterî, tutta intiera, e non soltanto quella dei prodotti velenosi.

Una differenza importante fra i patogeni tossici e i patogeni infettanti sta pure in ciò, che la malattia prodotta dai primi non può trasmettersi ad altri, mentre le vere infezioni sono *trasmissibili* da uno ad altro animale mediante l'innesto di una piccola quantità di sangue o di altro tessuto dell'animale infetto, contenente i germi infettanti.

9. Attenuazione.

Fra le proprietà biologiche dei microrganismi patogeni merita che si faccia parola in modo speciale dell'*attenuazione* che subisce il loro potere patogenico, ogni qualvolta lo sviluppo si compie in condizioni poco favorevoli di nutrizione o di temperatura. È questo un fatto di un grande interesse, tanto teorico che pratico, giacchè è intimamente collegato coll'altro dell'immunità, artificialmente acquisita mediante le vaccinazioni o innesti preventivi.

L'attenuazione della virulenza dei batterî si può ottenere per una duplice via:

Un primo modo è quello di fare sviluppare i batterî parassitarî, per un tempo più o meno lungo, e per un certo numero di

generazioni, in condizioni di vita diverse da quelle che loro offre l'organismo animale vivente. E qui lo sviluppo si può ottenere o nelle sostanze nutritive artificiali, oppure in certi animali, che hanno una debole recettività per quel dato agente specifico. In questo modo si ottengono artificialmente vere *varietà* nuove di microrganismi, i quali si distinguono da quelli originarî, non soltanto per l'affievolità o mancante virulenza, ma anche, come fu dimostrato da Flügge (1), per uno sviluppo più rapido e più rigoglioso nei mezzi artificiali di nutrizione.

L'attenuazione per mezzo della coltivazione nei mezzi nutritivi artificiali non si osserva in tutte le specie patogene. È stata osservata finora nel diplococco pneumonico, nel bacillo della lebbra, nel micrococco della risipola, nel bacillo della morva, in quello del colèra ed in quello della difterite.

Come esempî di attenuazione, prodotta mediante il passaggio del virus attraverso un organismo animale poco sensibile alla sua azione, citiamo il virus rabbico, che si attenua passando attraverso la scimmia, il bacillo del mal rosso dei suini, il quale mediante una serie di passaggi attraverso il coniglio perde la sua attività pel porco e il bacillo della morva che si attenua passando attraverso il cane.

Un fatto curioso, messo in luce da Pasteur, è quello che certi virus, passando attraverso animali poco sensibili, perdono è vero la loro attività verso gli animali più sensibili, ma acquistano invece di virulenza verso la specie nella quale si fanno sviluppare. Così, secondo le osservazioni di Pasteur, il bacillo del « mal rosso », passando attraverso il coniglio, perde il potere patogeno pel majale, ma diventa sempre più virulento pel coniglio.

Un altro modo di ottenere l'attenuazione consiste nel far risentire ai batterî l'influenza di certi agenti fisico-chimici per loro nocivi, sia per un tempo breve, ma con molta intensità, oppure con intensità minore e più lungamente.

Gli effetti sono diversi nell'un caso e nell'altro, per quanto l'attenuazione si produca egualmente: questa difatti è duratura e trasmissibile per eredità, soltanto quando è ottenuta a poco a poco, mentre invece, se risulta dall'azione di mezzi che agiscono intensamente e per breve tempo, è soltanto passeggera, giacchè la virulenza ricompare rapidamente nelle generazioni successive.

In ogni caso nei microrganismi così attenuati, invece di osservare un rigoglio di vita maggiore, come in quelli attenuati mediante le culture artificiali, si trova diminuito il potere e la rapidità di moltiplicarsi, e diminuita in pari tempo la resistenza verso gli agenti nocivi: si tratta adunque di un fenomeno di vera degenerazione del protoplasma cellulare, prodotta dall'influenza di quegli

(1) Flügge, *Studien über die Abschwächung virulenter Bacterien und die erworbene Immunität*, Zeitschrift f. Hygiene, 1888, p. 208.

agenti e proporzionata alla sua intensità. Difatti l'energia di sviluppo e il grado di resistenza verso i disinfettanti decrescono parallelamente coll' aumentare del grado di attenuazione; tanto che possiamo di questo fatto servirci come di un reagente abbastanza sensibile, per misurare il grado di attenuazione dei virus sottoposti a tali influenze.

Gli stessi agenti che producono l' attenuazione, se agiscono più a lungo, producono anche la morte dei microrganismi.

Fra gli agenti fisico-chimici, riconosciuti atti finora a produrre l'attenuazione dei batterî virulenti, annoveriamo principalmente la temperatura elevata ed alcuni acidi e sali (acido fenico, acido solforico, bicromato di potassa). Oltre a questi, si è riconosciuta in certi casi un'azione attenuante anche nel disseccamento, nell' ossigeno compresso e nella luce solare diretta.

Quanto alla *temperatura*, si possono adoperare o gradi elevati (50° a 100° C.) per un breve lasso di tempo, oppure temperature mediocri (42-43° C), fatte agire per un tempo più lungo.

Così i bacilli carbonchiosi, secondo Toussaint, si attenuano tenendoli a 55° C. per dieci minuti. Lo stesso effetto si ottiene, secondo Chauveau, mediante una temperatura di 52° C. fatta agire per quindici minuti, oppure con 50° C. in venti minuti. Pasteur ne ha ottenuto invece l' attenuazione *fissa* e *trasmissibile* mediante l'azione prolungata di una temperatura di 42-43° C. e con tal mezzo ha fabbricato i suoi vaccini (1° e 2°), destinati a rendere refrattarî gli animali dall'infezione carbonchiosa.

L'attenuazione progressiva che subiscono i bacilli del carbonchio, coltivati in tal guisa, si può seguire a passo a passo, sperimentalmente, come ha fatto Koch, inoculandoli in animali diversamente sensibili per l'infezione carbonchiosa. Si vede infatti che, dopo 10 giorni di sviluppo a 42° C., le culture non sono più in grado di uccidere le pecore, ma uccidono ancora i conigli; dopo 12 giorni hanno quasi perduto ogni virulenza pel coniglio, ma sono ancora virulenti per le cavie, e fra i dodici e i ventiquattro giorni si ha il così detto *carbonchio dei topi*, giacchè i bacilli finiscono coll' essere inattivi pel coniglio e per la cavia, ma sono invece ancora attivi pel topo bianco. Si ha dunque in questi animali un reattivo abbastanza sensibile per determinare il grado di virulenza dei bacilli che si vanno attenuando. I bacilli così attenuati sono stati coltivati da Koch per due anni di seguito, nelle migliori condizioni di temperatura e di nutrizione, facendoli sviluppare anche nell'organismo animale (topo), senza veder mai ricomparire la virulenza perduta.

Ciò dimostra che quella proprietà biologica, gradatamente acquisita, è addivenuta fissa e trasmissibile alle generazioni successive, mentre l' attenuazione ottenuta col metodo di Toussaint, o con quello di Chauveau, già dopo le prime culture fatte nelle condizioni ordinarie, cede il posto alla virulenza primitiva.

Un altro esempio di attenuazione per opera del calore si ha nel bacillo del carbonchio sintomatico. Arloing, Cornevin e Thomas (1) ne ottennero l'attenuazione mediante il calore secco a 85-90° C. oppure a 100-105°; e Kitt (2) l'ottenne col calore umido (vapor d'acqua) a 100° C.

Citiamo questi come esempì principali, per quanto vi sieno anche altri batterî virulenti, nei quali si è constatata l'azione attenuante del calore.

Riguardo all'azione attenuante di certi *acidi* e *sali*, citiamo di nuovo l'esempio del bacillo del carbonchio, il quale, secondo le esperienze di Roux e Chamberland, si attenua nelle culture a cui si aggiunga in piccole proporzioni l'acido fenico, o l'acido solforico, o il bicromato di potassa.

Anche i prodotti dello scambio materiale dei batterî esercitano talvolta su questi un'azione attenuante. È a questo fatto che devesi probabilmente l'attenuazione che si verifica mediante l'*invecchiamento* delle culture (colèra dei polli).

Quanto all'*ossigeno*, in condizioni ordinarie, come si trova questo gaz nell'atmosfera, non pare possa avere azione alcuna, per quanto Pasteur e la sua scuola abbiano per l'addietro attribuito ad esso una parte importante nel fenomeno dell'attenuazione (attenuazione del virus carbonchioso per opera del calore, e del virus del colèra dei polli nelle culture invecchiate). Invece l'ossigeno compresso può servire, secondo le esperienze di Chauveau, ad attenuare certi microrganismi (bacillo del carbonchio e bacillo del mal rosso dei suini).

La *luce solare diretta*, quale agente di attenuazione, è stata studiata specialmente da Duclaux (3) su di una forma di micrococco e da Arloing sul bacillo carbonchioso. È necessario però un numero maggiore di esperienze a questo riguardo, per stabilire quale parte spetti realmente alla luce e quale al calore o all'ossigeno in tale fenomeno. Il fatto in sè è molto importante, poichè può servire in parte a spiegare, sia l'attenuazione naturale che si osserva non di rado nei microrganismi patogeni, come pure il decorso ciclico delle infezioni.

Finalmente anche il *disseccamento* può produrre l'attenuazione di certi virus; e di questo mezzo si è servito appunto Pasteur per ottenere la serie di virus rabbici progressivamente attenuati, che servono per l'innesto preventivo della rabbia canina nell'uomo.

(1) Arloing, Cornevin et Thomas, *Le Charbon symptomatique du boeuf*. Paris, 1887.

(2) Kitt, *Ueber die Abschwächung des Rauschbrandvirus durch strömende Wasserdämpfe*. Centralbl. f. Bacteriologie, Bd. III p. 572.

(3) Duclaux, *Action de la lumière sur les microbes. Revue critique*. Annales de l'Institut Pasteur N. 2, 1887.

Riguardo alla maniera di spiegare il fenomeno dell'attenuazione, per quanto manchino ancora ricerche esatte al riguardo, pure da ciò che sappiamo sul meccanismo di azione dei batterî patogeni si può ragionevolmente dedurre, che l'attenuazione è dovuta probabilmente alla diminuita produzione di quelle sostanze nocive, che essi producono in condizioni normali.

Esprimiamo per ora questa idea sotto forma di una semplice ipotesi razionale, perchè la chimica biologica dei batterî, sia virulenti, che attenuati, è finora assai poco conosciuta; ma dobbiamo aggiungere eziandio che esiste già qualche dato sperimentale che la conforta, come è quello trovato da Behring (2) che i bacilli carbonchiosi virulenti producono nel loro sviluppo quantità di acidi notevolmente maggiori che quelli attenuati, i quali invece si distinguono alla loro volta per una maggiore attività di riduzione. Questo fatto indica già che i prodotti dello scambio materiale nei bacilli carbonchiosi virulenti e in quelli attenuati non sono gli stessi.

10. Immunità e innesto preventivo.

Un'altra proprietà importante dei microrganismi patogeni si è che questi non riescono egualmente dannosi per tutte le specie animali, ma invece ciascuno di essi predilige alcune date specie, riescendo innocente per altre. A questo riguardo si è anzi trovato che non soltanto le varie specie, ma anche le diverse razze e talora anche le semplici varietà di animali presentano differenze notevoli di recettività per i singoli agenti infettivi.

Per citare alcuni esempî di questo fatto, il batterio della così detta « setticemia dei conigli » uccide sicuramente i conigli e i topi bianchi ed è innocente invece per le cavie e per i ratti: il bacillo della « setticemia dei topi » (Koch) uccide sicuramente i topi grigi comuni, nei conigli provoca soltanto un' affezione locale e passeggera, ed è affatto innocuo pei topi di campagna; il micrococco tetragono è patogeno pel topo bianco e non lo è invece per quello grigio.

E non solo le varie specie, o razze, ma anche gl'individui di una stessa specie o razza reagiscono diversamente all'azione degli stessi microparassiti.

Il fatto è noto generalmente col nome di *disposizione* o *recettività individuale* per una data malattia, disposizione la quale fa sì che di un certo numero di individui, egualmente esposti all'assorbi-

(2) Behring, *Beiträge zur Aetiologie des Milzbrandes*. Zeitschrift. f. Hygiene 1889, Vol. 6.°, pag. 117 e Vol. 7.° pag. 171.

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

mento di germi patogeni, alcuni ammalino ed altri no; essa è perciò sempre necessaria, oltre alla presenza dell'agente infettante, perchè la infezione si sviluppi.

Si distingue una disposizione individuale *generale* ed una disposizione *locale*, in rapporto colla diversa maniera di agire e di introdursi dei varî microrganismi patogeni. Il fatto, che alcuni microbi riescono letali soltanto se introdotti per via sottocutanea, o per via intravenosa, serve a dimostrare quale e quanta influenza esercitino la porta d'ingresso del virus, e la disposizione locale, nel determinare gli effetti di quello sull'organismo animale.

Le cause che determinano codesta disposizione non sono ancora sicuramente conosciute. Si può dire soltanto che alcune risiedono nell'organismo stesso (condizioni degli elementi cellulari e della loro attività fisiologica), ed altre invece provengono dal difuori ed agiscono rendendo l'organismo più vulnerabile nel momento dell'invasione del germe patogeno.

Quanto alle prime, si è lo stato delle cellule esterne dell'organismo, le quali formano il rivestimento cutaneo e mucoso, quello che specialmente influisce sul determinare il grado vario di disposizione individuale. Si comprende di leggieri come lo stato di nutrizione, e massimamente l'età, debbano determinare negli epitelî certe differenze, le quali, per quanto minime, sono tuttavia sufficienti a permettere o ad impedire, a seconda dei casi, l'ingresso e lo sviluppo dei microparassiti. E che sia realmente così lo prova l'osservazione comune, che basta una leggerissima alterazione patologica di alcuni epitelî, come è quella che si verifica nel semplice catarro, per facilitare un'infezione. Un'altra prova sperimentale di ciò si ha pure nel fatto osservato da Löffler, che il bacillo della difterite può essere inoculato con successo solamente sulla mucosa vaginale delle cavie giovani, mentre è senza effetto negli stessi animali adulti.

E non soltanto lo stato delle cellule esterne, ma anche quello dei tessuti interni, sia delle cellule come dei liquidi organici, ha influenza sulla recettività individuale. Parlando delle teorie dell'immunità, vedremo in seguito come una certa parte, se non nella distruzione, per lo meno nella eliminazione dei microbi dall'organismo animale, spetti sicuramente sia alle cellule migranti, come alle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Ora l'attività di questi elementi può variare assai, secondo certe circostanze; e lo ha provato Wissokowitsch, allorquando ha dimostrato l'azione deleteria che esercitano i veleni, e specialmente le ptomaine batteriche sull'attività fagocitaria delle cellule endoteliali.

Oltre le condizioni degli elementi cellulari, anche la costituzione chimica dei liquidi dell'organismo esercita una grande influenza sul grado di recettività per le infezioni. Vedremo infatti in seguito qual parte importante spetti ai liquidi organici nella distruzione dei batterî; per ora accenniamo soltanto al fatto, che si può sperimentalmente far diventare sensibile per un agente infettivo una data specie animale, che di natura non lo è. Così, mentre i ratti, pel grado forte di alcalinità del loro sangue, sono per lo più refrattarî all'infezione carbonchiosa, si rendono invece sensibili per essa, cibandoli esclusivamente di vegetali, oppure mescolando al cibo il fosfato acido di soda (Behring). Lo stesso fatto è stato trovato da Leo (1) pel virus morvoso, il quale d'ordinario non attecchisce nei topi

(1) Leo, *Beitrag Zur Immunitätslehre*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 7, 1889, pag. 55.

bianchi, ma li uccide invece sicuramente, se in essi si è prodotto il diabete artificiale, cibandoli con florizzina.

Anche l' introduzione di sostanze velenose e dei prodotti elaborati da altri microrganismi può servire ad aumentare negli animali la recettività per le infezioni diminuendo in essi la resistenza organica.

Havvi finalmente una serie numerosa di agenti esterni, i quali possono influire sulla disposizione individuale. Gli squilibrii di temperatura, l'umidità, il vento, tutto quell'insieme di azioni che gli antichi designavano col nome di « cause reumatiche » devono avere anche esse un'importanza notevole, per quanto non ancora intimamente conosciute.

Come si verifica un grado massimo di recettività individuale per le malattie da infezione, così esiste pure di natura la mancanza assoluta di una tale disposizione; il che dicesi appunto *immunità naturale* o *refrattarietà*. Questa sorta di immunità può essere *congenita*, oppure *acquisita* mediante un primo attacco di quella data malattia.

È importante il ricordare che non per tutte le malattie infettive si verifica il fatto dell' immunità acquisita mediante un attacco del male, e che anzi sotto questo rapporto le varie infezioni si comportano in maniera molto diversa.

Così per alcune l' organismo, dopo avere superato una volta la malattia, diventa più sensibile per una seconda infezione della stessa specie; tale è il caso della risipola, della gonorrea, della polmonite e della febbre intermittente. Per altre invece si verifica il fatto che il secondo attacco è più benigno del primo; ma l'immunità è passeggera, non è sicura per tutti gli individui della stessa specie e non dura in tutti lo stesso tempo. In talune malattie però si verifica anche un'immunità persistente (esantemi acuti e tifo addominale). Finalmente per alcune malattie l'immunità è in relazione col grado d'intensità del primo attacco, e per altre invece basta anche una forma leggerissima di infezione per conferire l' immunità in maniera sicura.

Da ciò si vede come per questo fenomeno non si verifica una legge d' indole generale, valevole per tutte le malattie infettive, e che esso piuttosto ha caratteri speciali in ciascuna di esse. Questo si accorda con quanto si è già accennato in altra circostanza, che, cioè, le proprietà biologiche dei diversi microrganismi patogeni sono assai varie, e che non si può quindi generalizzare per tutti un fatto osservato per alcune specie soltanto.

Ma un fatto assai importante si è che noi possiamo anche *artificialmente* produrre nell'organismo animale lo stato di immunità, mediante le *vaccinazioni* o *innesti preventivi*.

È stata la vaccinazione jenneriana, praticata con tanto successo contro il vajuolo da più di cento anni, quella che ha dimostrato anzitutto l' importanza dell' immunità artificiale, come uno dei mezzi più adatti per combattere e infezioni.

Ma dal secolo scorso fino a pochi anni or sono non si era più fatto alcun serio tentativo per estendere la vaccinazione preventiva ad altre malattie. Fu una delle tante scoperte geniali di Pasteur, quella che diè il primo impulso al movimento rapido, a cui assistiamo ai nostri giorni, dell'applicazione pratica dell'innesto preventivo alla profilassi delle malattie da infezione.

Egli infatti scoprì anzitutto che le culture in brodo dei batterî del colèra dei polli invecchiando si attenuano, e che mediante l'innesto di tali culture si possono rendere refrattarî gli animali all'azione delle culture più virulente.

Da quel momento (1880), per opera dello stesso Pasteur e di altri, il mezzo profilattico dell'innesto preventivo è stato applicato, con vario successo, per gli animali al carbonchio, al carbonchio sintomatico, al colèra dei polli, al mal rosso dei suini, alla peripneumonite bovina, e per l'uomo alla profilassi della rabbia canina.

L'*immunità artificiale* può essere prodotta, mediante l'innesto preventivo, in diverse maniere. Si può anzitutto rendere immune l'organismo mediante l'innesto dello *stesso agente specifico* di quella certa malattia; possiamo, in secondo luogo, adoperare per lo stesso scopo un *agente specifico diverso*; e finalmente si può anche produrre l'immunità senza l'intervento di alcun microrganismo, ma semplicemente coll'innesto delle *sostanze chimiche solubili*, prodotte dallo scambio materiale dei batterî specifici.

Riguardo al primo modo di innesto preventivo, si può adoperare o l'agente patogeno dotato di tutta la sua virulenza, oppure lo stesso agente attenuato con uno dei processi già descritti. E siccome condizione fondamentale di qualsiasi processo d'innesto preventivo deve essere il fatto, che l'agente che si adopera riesca inoffensivo, o produca tutt'al più un'affezione morbosa leggera nell'animale inoculato, così, se si adopera il virus attivo, è necessario attenuarne gli effetti; e questo si ottiene, o introducendo quantità assai piccole di virus, oppure scegliendo una porta d'ingresso speciale, poco adatta per lo sviluppo di quei certi microrganismi.

Come esempio di immunità conferita mediante l'innesto di piccole quantità di virus attivo, ricordiamo il fatto osservato da Löffler, che una piccola quantità di cultura di bacillo della setticemia dei topi, inoculata sottocute nell'orecchio del coniglio, serve a renderlo refrattario agli innesti successivi di quantità maggiori dello stesso microrganismo.

Gli esempî di immunità prodotta coll'introduzione del virus nell'organismo per una via poco favorevole sono assai numerosi. Così pel carbonchio sintomatico, l'iniezione fatta nelle vene di una quantità di virus, anche maggiore di quella che introdotta per via sottocutanea serve ad uccidere gli animali, non solo riesce innocua, ma conferisce l'immunità. Un altro esempio consimile lo troviamo nella rabbia. Galtier dapprima e poscia Roux e Nocard hanno reso immuni gli animali erbivori, mediante l'iniezione endovenosa di forti dosi di virus rabbico attivo.

Questa diversità negli effetti prodotti dallo stesso agente patogeno, introdotto per vie diverse, e la immunità risultante dalla penetrazione del virus per una via

a lui poco propizia, si manifestano in maniera ancor più sorprendente nel carbonchio sintomatico, allorquando l'agente patogeno di questa malattia si introduce nel tessuto connettivo compatto, sotto la pelle della coda dei bovini. Quivi infatti non produce che effetti locali passeggeri e conferisce l'immunità verso gli innesti ulteriori; mentrechè, inoculato nel tessuto connettivo lasso di altre località, ha per conseguenza l'infezione generale e la morte.

Un' altra malattia degli animali domestici, contro la quale si è pure applicato con successo l' innesto preventivo del virus non attenuato, introdotto in piccola quantità e per una via poco favorevole, è la così detta « peripneumonite dei bovini » (Lungensen). Da alcuni si è adoperato per lo innesto (fatto alla base della coda) il succo polmonare fresco, filtrato, dell' animale morto della stessa malattia (Pütz (1)) e da altri il prodotto delle culture del microrganismo specifico (Pöels e Nolen (2)).

Il metodo però, che ha dato finora migliori risultati e che è stato anche applicato all'uomo, è quello dell'innesto dello stesso virus, ma attenuato in una maniera qualsiasi.

È questo il metodo usato per la profilassi del carbonchio propriamente detto, del carbonchio sintomatico e del mal rosso dei suini, per gli animali, e per quella della rabbia canina per gli animali e per l'uomo.

Pel *carbonchio* il metodo più usato è quello di Pasteur, secondo il quale si praticano due innesti, col 1° e col 2° vaccino, preparati nel modo già detto, coll'intervallo di 12 giorni fra l'uno e l'altro innesto. Specialmente dopo l'inoculazione del secondo vaccino, più forte, gli animali vanno soggetti ad un leggero attacco di malattia (febbre vaccinale), il quale sembra specialmente importante per produrre l'immunità.

Questo metodo ha destato nel mondo scientifico polemiche vivaci, che non sono ancora terminate. In Germania esso ha incontrato opposizione specialmente da parte della scuola di Koch, il quale, ripetendo le prime esperienze di Pasteur, ha messo in evidenza alcune imperfezioni del metodo. Queste consistono anzitutto in ciò, che il processo d'attenuazione non permette mai, per quanto si cerchi di mantenere costante la temperatura, di avere un virus con un grado fisso di attività. Bisogna, di quando in quando, provarne l'azione sulle tre specie di animali sopra dette, topo, cavia e coniglio; ed anche in tal guisa, si può pel 1° vaccino avere un criterio abbastanza sicuro in ciò, che esso non deve più uccidere che i topi, ma pel 2° vaccino il criterio sperimentale non è più così certo. Il 2° vaccino difatti si dice che uccide ancora le cavie, e non uccide più sicuramente i conigli; cosicchè può la sua virulenza oscillare entro certi limiti, e questo in pratica fa si, che alcuni degli animali inoculati possono anche morire per effetto dello stesso vaccino.

Un altro difetto rilevato da Koch si è che, se le vaccinazioni fatte col metodo Pasteur servono a rendere sicuramente immuni gli animali dall' innesto

(1) Pütz, *Ueber den Kampf gegen die Lungenseuche*, Oesterr. Vereins- Monatsschrift VIII.

(2) Poels u. Nolen, *Das Contagium der Lungenseuche*, Rundschau auf dem Gebiete der Thiermedicin etc., 1886, N. 20 e 21.

sottocutaneo del virus, non servono però sempre a preservarli contro l'introduzione dei bacilli sporigeni nel canale alimentare; il qual modo di infezione si verifica appunto per lo più negli erbivori in condizioni naturali.

Con tutto questo però, e malgrado i risultati poco favorevoli ottenuti in Germania, la pratica fatta di tal metodo su vasta scala, in Francia per opera di Pasteur e dei suoi discepoli ed in Italia per opera specialmente di Perroncito, ha dimostrato ormai in maniera non dubbia l'utilità pratica di tale vaccinazione.

La diversità dei risultati, ottenuti specialmente nei primordi dell'applicazione del metodo, trova la sua ragione, sia nella difficoltà di preparare vaccini adatti, come nel fatto che questi perdono presto la loro efficacia preservatrice. A tutti e due questi inconvenienti si è ora rimediato in gran parte; rimane soltanto ancora un fatto poco favorevole all'utilità pratica di simili innesti, ed è che l'immunità da essi conferita non dura che pochi mesi, od un anno tutt'al più.

Secondo le ricerche di Chauveau, il virus carbonchioso, attenuato mediante l'azione prolungata dell'ossigeno compresso (8 atmosfere) durante lo sviluppo del bacillo a 38°-39° C., avrebbe il vantaggio di conservare a lungo, anche per qualche mese, la sua facoltà preservatrice per gli animali e di aver bisogno di una sola inoculazione per conferire sicuramente l'immunità. Questo metodo però offre l'inconveniente della difficoltà di preparazione del vaccino e dell'incostanza nel grado suo di attenuazione.

Anche pel *carbonchio sintomatico* si può conferire l'immunità mediante le vaccinazioni, fatte con virus attenuato col processo di Cornevin, o con quello di Kitt.

Secondo Cornevin, si prepara anzitutto il virus attivo in forma di polvere, pestando e disseccando i tessuti animali che lo contengono (pezzi del tumore); con questa polvere si prepara il 1° vaccino, stemperandola nell'acqua e tenendola a 100° C per 6-7 ore, ed il 2° vaccino operando egualmente ad una temperatura di 85° C. Le due vaccinazioni si fanno con un intervallo di 9-14 giorni.

Secondo Kitt (1), il succo dei tessuti virulenti, disseccato, si attenua sottoponendolo all'azione del vapor d'acqua a 100° C. per sei ore, e basta una sola vaccinazione fatta con questo virus per conferire l'immunità.

Le esperienze fatte finora sull'applicazione di tali metodi, specialmente nella Svizzera, danno per risultato concorde che le vaccinazioni sono innocue e rendono gli animali sicuramente refrattarî all'infezione naturale.

Lo stesso metodo di vaccinazione è stato proposto da Pasteur anche pel così detto « mal rosso » dei suini, attenuando il virus mediante il passaggio attraverso l'organismo del coniglio e preparando, come pel carbonchio, un 1° e un 2° vaccino. L'utilità pratica di siffatta vaccinazione è ancora discussa, perchè il 2° vaccino produce talora la morte degli animali. È a dirsi però che gli animali vaccinati si mostrano realmente refrattarî, sia all'innesto artificiale, come al modo d'infezione naturale.

(1) Kitt, *Ueber die Abschwächung des Rauschbrandvirus durch strömende Wasserdämpfe.* Centralblatt f. Bacteriologie Bd. III, p. 572 e 605, 1888.

Tralasciamo di parlare dello innesto preventivo *del colèra dei polli e del vaiuolo degli ovini* (ovinizzazione), giacchè i risultati pratici sono finora assai incerti.

Diciamo invece brevemente del metodo di cura Pasteur contro la *rabbia canina.* Per questa malattia le vaccinazioni nell'uomo si praticano dopo avvenuta l'introduzione del virus, approfittando del lungo periodo di incubazione, che essa offre generalmente.

Il virus rabbico, sconosciuto ancora nella sua natura, si trova concentrato allo stato di purezza nell'asse cerebro-spinale degli animali morti di rabbia. Questo virus, passando attraverso al coniglio, aumenta di intensità fino a un certo grado, che rimane poi costante anche negli ulteriori passaggi attraverso lo stesso animale. Il midollo spinale di coniglio fatto morire mediante l'innesto endocranico del virus rinforzato (virus costante di Pasteur), contenente il virus allo stato di purezza, si fa attenuare mediante il disseccamento a 22°-24° C, tenendolo sospeso entro bottiglie di vetro sterilizzate, chiuse con ovatta e contenenti nel fondo un po' di potassa caustica.

Dopo 12-14 giorni, i midolli così disseccati hanno perduto qualsiasi virulenza e, da quello di 14 giorni fino a quello di un giorno, costituiscono una serie di virus di attività sempre crescente. Stemperando nel brodo o nell'acqua salata, sterilizzata, un pezzo di questi midolli ed iniettando sotto cute nei cani siffatte emulsioni, a cominciare dal midollo di 14ª giornata e andando progressivamente fino a quello di 1 giorno, si riesce a rendere i cani sicuramente refrattarî all'azione del virus rabbico comune (virus della rabbia di strada di Pasteur), introdotto, sia per mezzo della morsicatura, come per mezzo dell'iniezione sottocutanea o sottomeningea. Talora, adottando un metodo di vaccinazione speciale, più intenso, si riesce a rendere i cani immuni anche verso l'azione del virus rinforzato nel coniglio.

Anche per la rabbia si può produrre l'immunità coll'innesto del virus attivo, fatto per una via poco favorevole alla sua azione.

Così Pasteur ha visto talora i cani sopravvivere all'iniezione sottocutanea di una grande quantità di virus attivo, e addivenire così refrattarî anche all'innesto sottomeningeo. Oltre a ciò, come si è già detto, gli animali erbivori (vitello, montone) si possono anche rendere refrattarî mediante l'iniezione endovenosa di virus rabbico attivo.

Nell'uomo morsicato da animali rabbiosi si pratica lo stesso metodo di cura preventiva, che serve pel cane. Non potendo entrare in dettagli a questo riguardo, diremo soltanto che il metodo primitivo di Pasteur è stato in seguito modificato specialmente in

ciò, che non si inoculano più i midolli molto virulenti (in generale non si oltrepassa quello di 3ª giornata) e si introduce invece una quantità di materiale molto maggiore che non in principio (cura ntensiva per quantità).

In tal guisa la mortalità per rabbia nell'uomo, che era già notevolmente diminuita appena dopo introdotto il metodo Pasteur, è andata progressivamente diminuendo negli ultimi tempi, in seguito alle modificazioni sopra accennate.

Non è qui il luogo di discutere le numerose obbiezioni mosse alle vaccinazioni antirabbiche, e le acerbe polemiche sollevate in proposito. Basti in risposta accennare al fatto, che soltanto nell'Istituto di Parigi furono, dal 1886 a tutto il 1890, vaccinate 9433 persone morsicate, e che la mortalità in esse fu nel 1886 di 0,94 %, nel 1887 di 0,73, nel 1888 di 0,55, nel 1889 di 0,33 e nel 1890 di 0,32 %. Ora le statistiche antiche, precedenti al metodo Pasteur, davano una mortalità complessiva percentuale di 10, 15 a 20 %, cosicchè, anche prendendo la cifra più bassa, non vi può essere dubbio sull'efficacia del metodo.

Questa del resto si manifesta in maniera assai più spiccata nelle statistiche parziali ed in quelle delle persone morsicate da lupi rabbiosi, che erano raccolte esattamente, anche prima della scoperta di Pasteur.

Così le statistiche dei morsicati alla testa davano una mortalità di 80-88 %; la statistica dell'Istituto Pasteur dà invece una mortalità di 2,36 %. Pei morsicati da lupi rabbiosi le statistiche antiche offrivano il 62-64 % di morti; quelle odierne degli istituti antirabbici danno soltanto 8-9 %.

Il risultato pratico di tali vaccinazione non può oramai essere posto in dubbio. Forse ulteriori perfezionamenti nel metodo potranno ancora diminuire la cifra, digià così bassa, della mortalità; ma, secondo ogni probabilità, anche nell'uomo si verifica il caso uguale a quello che si osserva negli animali d'esperienza, nei quali si incontrano individui che non si rendono in alcun modo refrattarî all'azione degli agenti patogeni infettanti. La proporzione esigua adunque della mortalità nei vaccinati col metodo Pasteur, anzichè oppugnare la bontà del metodo, sta piuttosto a rappresentare un fenomeno fisio-patologico, che si verifica nell'uomo del pari che negli altri animali (1).

La *vaccinazione antivaiuolosa*, generalmente conosciuta nei suoi principî e nei suoi effetti, secondo alcuni è da riporsi nella categoria di quelle in cui l'immunità viene prodotta da un agente patogeno di specie diversa, mentre secondo altri, e più probabilmente, l'agente produttore del vaccino delle vacche non è che una varietà attenuata di quello produttore del vajuolo umano, e l'immunità per questa malattia viene quindi prodotta dall'innesto dello stesso virus, più debole.

Se il vaccino della vacca, innestato nell'uomo, conserva costante il suo debole potere infettante, ciò non costituisce affatto un ar-

(1) Perdrix, *Les vaccinations antirabiques à l' Institut Pasteur. Resultats statistiques.* Annales de l'Institut Pasteur, 1890, pag. 129, 1891 pag. 344.

gomento contrario all' opinione ultima sopra citata; giacchè sappiamo che anche altri virus, una volta attenuati, conservano fissa ed ereditariamente trasmissibile la nuova proprietà.

Ma l'immunità artificiale può essere conferita anche mediante l'innesto dei *prodotti chimici* dei batterì, senza bisogno che questi sieno introdotti nell'organismo animale. Questo fatto è di grande importanza, sia dal lato pratico, perchè si possono in tal modo eliminare i pericoli inerenti allo sviluppo dei germi patogeni nell'organismo, come anche dal lato scientifico, perchè esso ci può, fino ad certo punto, spiegare come si produca la immunità per opera delle diverse maniere di innesto preventivo.

Come, infatti, nel produrre l'infezione coi suoi sintomi morbosi entra in giuoco principalmente l'azione delle sostanze chimiche elaborate dai batterì, così l'introduzione di questi prodotti, modificati in quantità o in qualità, può servire a rendere l'organismo refrattario all'azione dell'agente infettante.

Gli esempì di questa maniera di innesto preventivo sono già abbastanza numerosi, ma riguardano finora soltanto malattie degli animali.

Salmon e Smith (1) furono indubbiamente i primi a dimostrare sperimentalmente la possibilità di rendere immuni gli animali mediante l'iniezione delle sostanze chimiche prodotte dai microrganismi patogeni; e lo fecero iniettando nei colombi le culture in brodo, sterilizzate, del bacillo del mal rosso de' suini.

In seguito lo stesso fatto fu dimostrato da Wooldridge (2) pel carbonchio, da Charrin (3) per l'infezione piocianica, da Foà e Bonome (4) per quella da proteo volgare, da Roux e Chamberland (5) per l'edema maligno e pel carbonchio, da Roux (6) pel carbonchio sintomatico.

Finalmente l'immunità artificiale per una data infezione si può

(1) Salmon and Smith, *On a new method of producing immunity from contagious diseases*, Proceedings of the biol. Soc. of Washington, 22 Febr. 1886.

(2) Wooldridge, *Note on protection in Anthrax*, Proceedings of the royal Society, Vol. 42, 1887.

(3) Charrin, *Sur des procedès capables d'augmenter la résistence de l'organisme à l'action des microbes*, Compt. rend. Acad. des Sc., 1887, p. 756.

(4) Foà e Bonome, *Contribuzione allo studio delle malattie infettive*. Giornale della R. Accademia di medicina di Torino, N. 11-12, 1887.

(5) Roux e Chamberland, *Immunité contre la septicémie conférée par des substances solubles*, Annales de l'Institut Pasteur N. 12, 1887. — *Sur l'immunité contre le charbon conferée par des substance ssolubles*, Annales Pasteur, N. 8. 1888.

(6) Roux, *Immunité contre le charbon symptomatique conferée par des substances solubles*, Annales Pasteur, N. 2, 1888.

anche produrre mediante l'innesto dell'agente specifico di un'altra malattia.

Il primo fatto del genere fu osservato da Pasteur, il quale vide che i polli, i quali sono suscettibili di contrarre l'infezione carbonchiosa mediante il raffreddamento, divengono refrattarî per questa infezione, allorquando sono stati precedentemente vaccinati col bacillo attenuato del colèra dei polli.

Lo stesso effetto ottenne in seguito Emmerich (1) nelle cavie e nei conigli coll'innesto dello streptococco della risipola, Pawlowsky (2) con quello del pneumo-bacillo di Friedlander e di altri microrganismi patogeni, Zagari (3) con quello del bacillo della peste suina e Bouchard (4) col bacillo piocianico.

Quest'ultimo metodo di vaccinazione preventiva non ha però dato risultati così netti e brillanti, come quelli esposti in precedenza.

Questi sono i mezzi principali e meglio studiati, coi quali si può ottenere l'immunità artificiale. Vi sono però anche altri esempî di immunità, prodotta in diversa maniera. Così Wooldridge (5) ha reso immuni i conigli dall'infezione carbonchiosa coll'iniezione di una soluzione albuminoide, estratta dal timo e dai testicoli di vitello: Foà e Bonome (6) hanno ottenuto l'immunità per l'infezione da proteo, mediante un miscuglio di colina e neurina: Behring e Kitasato (7) hanno prodotto l'immunità pel tetano col tricloruro di iodio e Behring (8) per la difterite col perossido d'idrogeno.

Questi esempî, finora isolati, di immunità ottenuta per via chimica meritano un'attenzione speciale, perchè possono forse aprire una nuova strada per ottenere l'immunità, praticamente più sicura delle altre; giacchè, trattandosi di sostanze chimiche ben definite, si riesce più facilmente a graduarne la dose ed a sorvegliare l'azione sull'organismo.

(1) Emmerich, *Heilung von Infectionskrankheiten. Vernichtung von Milzbrandbacillen im Organismus*, Berl. klin. Wochenschr., 1886, N. 50.

(2) Pawlowsky, *Heilung des Milzbrands durch Bakterien* ecc, Wirchow's Archiv. Bd. 108, 1887.

(3) Zagari, *Esperienze sulla concorrenza vitale dei microrganismi e sopra un nuovo mezzo di profilassi carbonchiosa*, Giorn. intern. delle Scienze mediche, 1887.

(4) Bouchard, *Influence qui exerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du bacille pyocyanique*, Comptes rendus de l'Acad. d. Sciences, 1889, p. 713.

(5) Wooldridge, *Versuche über Schutzimpfung auf chemischem Wege*, Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abth., 1888, p. 527.

(6) Foà e Bonome, *Ueber Schutzimpfungen*, Zeitschr. f. Hygiene, 1888, Vol. 5, pag. 415,

(7) Behring u. Kitasato, *Ueber das Zustandekommen der Diphterie-u. Tetanusimmunität bei Thieren*, Deutsche med. Wochenschr. N. 49, 1890.

(8) Behring, *Untersuch. üb. das Zustandekommen der Diphterieimmunität bei Thieren*, Ibid. N. 50.

Come si vede, i fatti relativi all'immunità artificiale sono abbastanza numerosi e bene studiati; e con tutto ciò, il meccanismo col quale l'immunità si produce resta ancora in gran parte oscuro. Noi non sappiamo ancora infatti, con certezza, quali sieno le sostanze veramente attive nel produrre l'immunità, nè in qual maniera esse agiscono nell'organismo; e quindi non conosciamo neppure sicuramente quali sono i mezzi di cui si serve l' organismo reso immune, per impedire lo sviluppo dei batterì patogeni in esso introdotti.

Riguardo alla prima parte del quesito, l'idea più semplice che si affaccia alla mente è quella che l'immunità si produca per una specie di abitudine, che l'organismo acquista mediante l' innesto preventivo verso l'azione delle sostanze tossiche (tossine, tossialbumine), prodotte dai batterî specifici.

Questo però non sempre si verifica, perchè in certi casi gli animali resi immuni resistono all'azione dell'agente specifico, e non a quella dei suoi prodotti velenosi, come hanno dimostrato Roger e Charrin per l'infezione piocianica e Gamaleja per quella da vibrione di Metschnikoff. Secondo Buchner (1) poi, più che i prodotti solubili, sarebbero invece le sostanze proteiche del protoplasma batterico quelle che sono specialmente attive nel produrre l'immunità.

E così riguardo alla maniera con cui le sostanze attive agiscono sull'organismo nel produrre l'immunità, poco vi è finora di bene accertato. In certi casi sembra, come ad es. nell' immunità prodotta dai virus attenuati, che sia quasi un attacco leggero della malattia quello che produce l'immunità, giacchè in seguito alle vaccinazioni si manifesta talvolta nell'organismo una reazione febbrile (febbre vaccinante); ma anche questa in altri casi manca del tutto.

In quanto finalmente ai mezzi, che nell'organismo immune servono ad impedire l'infezione, che è quanto dire la moltiplicazione e la diffusione dei germi specifici in esso introdotti, questo problema riguarda tanto l'immunità, quanto la guarigione delle malattie infettive; e intorno ad esso hanno attivamente lavorato, in questi ultimi tempi specialmente, i ricercatori più eminenti, creando una serie di ipotesi e di teorie, basate, quale più quale meno, su fatti osservati, e che meritano di essere esposte con qualche particolare, anche perchè intimamente connesse col problema pratico della guarigione delle infezioni.

(1) Buchner, *Ueber pyogene Stoffe in der Bacterienzelle*, Berl. Klin. Wochenschrift, 1890, p 673. — Id., *Die chemische Reizbarkeit der Leucocyten und deren Beziehung zur Entzündung und Eiterung*, Berl. Klin. Wochenschr., 1890, pag. 1084.

11. Teorie dell' immunità.

Per qualunque via, di quelle suesposte, venga prodotta l'immunità, noi dobbiamo rappresentarci il meccanismo della sua produzione, come il risultato di una lotta fra l'organismo animale da una parte e i microparassiti coi loro prodotti dall'altra. Da questa lotta, allorquando i microrganismi vengono inoculati in troppo piccola quantità, o per una via poco favorevole, o in uno stato di minore energia (attenuazione), l'organismo esce vincitore, non solo, ma reso anche più forte contro un secondo attacco dell'agente patogeno. Con questo però resta sempre a spiegarsi la natura di questa lotta, il terreno in cui si compie e i mezzi nuovi che acquista per essa l'organismo, valendosene poscia per vincere la battaglia contro il nemico più forte.

Prima di passare a parlare della maniera con cui si può spiegare il fenomeno dell'immunità, è bene accennare anzitutto che è necessario distinguere, anche da questo punto di vista, la immunità naturale da quella artificialmente conferita, e spiegare inoltre con maggiori particolari il concetto che esprime per noi la parola « immunità ».

Prendendo per punto di partenza la differenza stabilita fra la vera infezione e l'intossicazione semplice, noi riteniamo un organismo « immune » verso un dato agente patogeno, solamente allorquando non è più possibile in esso la moltiplicazione di quel germe. Da ciò deriva una distinzione importante da fare fra quei microrganismi i quali, penetrati nell'organismo animale, si diffondono dappertutto e quelli invece il cui sviluppo si localizza in un dato punto, diffondendosi invece da questo soltanto i prodotti nocivi del loro sviluppo. Pei primi infatti si ha una sola specie d'immunità; mentre pei secondi, oltre la vera immunità, secondo la definizione sopra esposta, si può anche ottenere nell'organismo animale una semplice refrattarietà all'azione dei prodotti velenosi del microrganismo, senza che resti perciò impedito il suo sviluppo nell'organismo animale, e senza che perciò si possa parlare di vera e propria immunità.

Questa distinzione si è fatta specialmente in virtù degli studî fatti in questi ultimi tempi sull'immunità artificiale, i quali hanno dimostrato che si può rendere un animale immune verso un dato microrganismo, senza che per questo addivenga refrattario all'azione dei veleni da quel microrganismo prodotti, e che, viceversa, si può conferire agli animali semplicemente la refrattarietà all'azione dei veleni batterici, del pari che all'azione di analoghi veleni

vegetali; come ha provato Ehrlich (1) colle sue esperienze sulla refrattarietà conferita verso i principî attivi dei semi di ricino (ricina) e di jequirity (abrina).

Dopo tali spiegazioni, veniamo a parlare delle teorie emesse per ispiegare il fenomeno dell'immunità; teorie che possono principalmente ridursi a quattro, come segue:

Si è creduto, anzitutto, che succeda nell'organismo quello che succede d'ordinario nelle culture artificiali dei microrganismi, dove l' accumularsi dei prodotti dello scambio materiale serve ad impedire l'ulteriore sviluppo dei microbi della stessa specie, od anche di specie diverse. Secondo questa ipotesi infatti, dopo una prima invasione dei batterî patogeni nell'organismo, resterebbero in questo piccole quantità dei loro prodotti, che impediscono lo sviluppo vittorioso dei batterî in una seconda loro invasione.

Quest'ipotesi è basata da un lato sul modo di comportarsi di certi microrganismi nei mezzi di cultura, e dall' altro sul fatto già ricordato, che le sostanze chimiche solubili prodotte dai batterî possono, senza il concorso di questi, produrre l'immunità.

Riguardo al primo ordine di fatti, le ricerche eseguite da Sirotinin (2) nel laboratorio di Flügge tolgono ad essi molta importanza per l'ipotesi in questione, giacchè dimostrano che, nella maggioranza dei casi, ciò che impedisce nelle culture l'ulteriore sviluppo dei microrganismi non è che un eccesso di acido o di alcali, liberi; tali corpi è noto che non possono soggiornare nell'organismo animale, se non per un tempo assai breve.

Invece le esperienze di Roux e Chamberland sull'immunità conferita mediante l'iniezione dei liquidi di cultura sterilizzati sembrano venire in appoggio di quest'ipotesi. Se ben si guarda però, si vede che l'immunità prodotta per questa via, meglio che colla permanenza nell'organismo delle sostanze introdotte, che non è in armonia colle leggi ordinarie dello scambio materiale, si può spiegare con Flügge mediante l'azione irritante esercitata da quelle sostanze sugli elementi del corpo animale, i quali reagiscono poscia con maggiore energia contro i batterî. E difatti certi liquidi che si adoperano per produrre l'immunità (ad es. il liquido dell'edema maligno) costituiscono ancora un mezzo di nutrizione adatto per lo sviluppo dei rispettivi microrganismi, ed il sangue e il succo degli animali resi immuni si mostrano egualmente propri alla coltivazione degli stessi microbi.

Con tutto questo però non possiamo respingere in modo assoluto una tale teoria, giacchè non si può da ciò che si osserva nelle culture (Sirotinin) indurre, che lo stesso avvenga anche nell'organismo animale; ed anche perchè noi non sappiamo con precisione quanto tempo restano nell'organismo i prodotti dello scambio materiale dei batterî, tanto più che alcuni di essi, di natura albuminoide. sono poco solubili e poco diffusibili, e perciò difficilmente eliminabili dall'organismo.

(1) Ehrlich, *Experimentelle Untersuchungen über Immunität*, I. *Ueber Ricin*, Deutsche med. Wochenschr. 1891, N. 32 — II. *Ueber Abrin*. Ibidem N. 44.

(2) Sirotinin, *Ueber die Entwickelungshemmenden Stoffwechselproducte der Bacterien und die sog. Retentionshypothese*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 4, 1888, p. 262.

Una seconda ipotesi, sostenuta principalmente da Klebs e da Pasteur, ammette invece che nel corpo animale venga consumata dalla prima invasione di microparassiti una qualche sostanza, che è indispensabile al loro sviluppo; attalchè, allorquando vi penetrano un' altra volta, non trovano più un terreno adatto per la loro moltiplicazione.

Questa ipotesi è basata specialmente sul fatto, che alcune forme di batterî si mostrano sensibili anche alla presenza di minime quantità di certi componenti nel mezzo di cultura, senza di che il loro sviluppo non si avvera. È nota generalmente l'esperienza di Raulin, il quale ha dimostrato che la presenza, o meno, di piccolissime quantità di certi sali minerali nel liquido di nutrizione esercita un'influenza assai spiccata sullo sviluppo dell'*Aspergillus niger*.

Realmente però l'analisi dei terreni di cultura, nei quali si è arrestato lo sviluppo dei microrganismi, dimostra che un tal fatto soltanto in pochi casi è dovuto al consumo di qualche sostanza nutritiva; mentre d'altronde non è verosimile che nell'organismo animale possa verificarsi il consumo completo e permanente di uno qualsiasi dei suoi componenti.

Le esperienze di Bitter (1) e di Nuttall (2), fatte a riguardo del bacillo del carbonchio, del mal rosso dei suini e del colèra dei polli, hanno poi dimostrato che il succo dei tessuti di animali morti per quelle infezioni e di animali resi immuni mediante l'innesto preventivo è egualmente adatto allo sviluppo dei relativi microrganismi, come quello degli animali sani.

La teoria adunque di Klebs e di Pasteur manca finora di un fondamento di fatto, sicuro e ben constatato.

Veniamo ora alle due ipotesi che hanno maggiore fondamento, e sulle quali è ancora viva la discussione. Di queste, l'una ammette che la distruzione dei batterî nell'organismo reso immune avvenga per opera di certi elementi cellulari (teoria dei fagociti di Metschnikoff), e l'altra invece che essi vengano uccisi per opera di sostanze chimiche prodotte dalla reazione degli elementi dei tessuti.

Il punto di partenza della teoria di Metschnikoff fu l'avere egli osservato che, nelle Dafnie, piccoli crostacei d'acqua dolce, le spore di un microparassita speciale di questi animali (*Monospora bicuspidata*) vengono assorbite da cellule analoghe ai leucociti, e che quando quelle spore sono in numero scarso, da potere essere assorbite tutte quante dagli elementi cellulari, l'animale non muore, mentre in caso contrario soccombe all'invasione dei parassiti.

(1) Bitter, *Kommt durch die Entwickelung von Bacterien im lebenden Körper eine Erschöpfungde rselben an Bacterien-Nährstoffen zu Stande?* Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 4, 1888, pag. 291.

(2) Nuttall, *Experimente über die bacterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers*, Ibid. pag. 353.

In seguito Metschnikoff ha esteso le sue ricerche agli animali superiori, sostenendo che anche in questi nelle infezioni si compie una vera lotta degli elementi cellulari contro l'invasione dei microrganismi. Secondo Metschnikoff, le cellule migranti o leucociti (*microfagi*), ed altre cellule derivanti dal foglietto medio del blastoderma, il cui tipo si trova in certi grandi cellule della milza (*macrofagi*), hanno la facoltà di incorporare i microbi penetrati nell'organismo, e, una volta incorporati, di digerirli e distruggerli. Con questo si spiegherebbe la guarigione delle infezioni; e l'immunità, naturale od acquisita, sarebbe dovuta ad un maggior potere (naturale, od acquisito mediante l'abitudine per opera dei vaccini) dei fagociti di incorporare e di uccidere i microrganismi invasori.

Una tale ipotesi, splendida per concezione, è stata in principio accolta generalmente con caldo entusiasmo. Il suo inventore ed altri ricercatori (Hess, Ribbert, Lubarsch, ecc.) andarono a gara per accumulare fatti in appoggio della nuova dottrina; ed oggidì non si può negare che essa ha per base i risultati di osservazioni abbastanza numerose. Pei bacilli del carbonchio nella rana e nel coniglio reso immune, per gli spirilli della febbre ricorrente, per i parassiti malarici e per i cocchi della risipola nell'uomo, è indubbiamente provato che la guarigione della malattia, ossia il cessare della moltiplicazione degli agenti patogeni, va connesso coll'assorbimento e col disfacimento loro nell'interno dei così detti fagociti.

Ma da ciò all'affermare che queste cellule sono atte ad impegnare una vera lotta coi microparassiti, e che sono esse che principalmente servono a proteggere l'organismo dalla loro invasione, corre ancora un gran passo. E difatti oggidì si può dire che una critica scientificamente severa, appoggiata su dati di fatto positivamente constatati, ha scosso non poco il bell'edificio, non per ciò che riguarda la realtà dei fatti osservati, ma specialmente riguardo all'interpretazione e all'importanza loro.

La prima obbiezione, la più naturale, che si poteva fare a questa teoria, era quella che i microparassiti vengano assorbiti dalle cellule soltanto quando sono morti o prossimi a morire, e non quando sono ancora dotati della loro piena attività.

E difatti una serie numerosa di osservatori, fra i quali basti citare Baumgarten, Fahrenholtz, Petruschky, hanno anzitutto dimostrato che i fagociti non si trovano sempre là dove à maggiore il pericolo (infezioni generali mortali, setticemie), ossia lè dove esistono batterî in copia, e dotati di tutta la loro energia, mentre invece talvolta si raccolgono dopo che l'attacco dei microrganismi

invasori è già compiuto, ed in località dove è già scomparso il pericolo maggiore.

Con questo però non resta distrutta la realtà del fatto osservato da Metschnikoff, da Ribbert e da altri, che i batterî possono anche venire ingoiati dalle cellule quando sono ancora viventi ed attivi, e che subiscono una degenerazione e si disfanno nell'interno di esse.

Ma gli osservatori sopra citati hanno anche dimostrato un fatto più importante, il quale dimostra che i batterî possono venire distrutti nell'organismo all'infuori di qualsiasi azione degli elementi cellulari. E difatti, introducendo sotto la pelle di animali immuni microrganismi virulenti, avvolti in sacchetti di carta bibula, o in membrane vegetali od animali, essi restano uccisi egualmente, anche senza partecipazione dei leucociti, per opera semplicemente dei succhi corporei.

La fagocitosi adunque non costituisce l'unico mezzo di cui dispone l'organismo per combattere gli agenti infettivi. È senza dubbio un processo che riesce utile in molti casi, ma che forse è da mettersi in linea secondaria ad un altro fenomeno studiato di recente, che è la così detta *chemiotassi*, ossia una specie di sensibilità chimica che hanno i leucociti, la quale fa sì che essi vengano attratti da certe sostanze, e respinti da altre (chemiotassi positiva e negativa).

Fra le sostanze capaci di esercitare uno stimolo sui leucociti vanno annoverati appunto i prodotti solubili dei batterî, o, come vuole Buchner, le proteine del loro protoplasma. Secondo Buchner (1), le proteine batteriche, al contrario dei prodotti solubili, ptomaine, tossine, ecc., non si separano dal protoplasma cellulare allorquando i batterî sono nel pieno loro sviluppo, ma sibbene quando sono in qualche modo alterati e prossimi a morire. Cosicchè tanto è più energica l'azione dei liquidi dell'organismo sui batterî invasori, e tanto più copiosa sarebbe la separazione da questi delle proteine batteriche, e l'azione loro chemiotassica sui leucociti. Così si spiegherebbe il fatto che, allorquando si tratta di batterî molto virulenti, i fagociti mancano quasi completamente.

Quest'opinione di Buchner non può però finora dirsi sicuramente dimostrata, giacchè il fenomeno ora accennato potrebbe egualmente ricevere una spiegazione coll'esistenza di prodotti solubili fabbricati dai batterî virulenti, capaci di esercitare un'azione chemiotassica negativa sui leucociti.

(1) Buchner, *Ueber Immunität, deren natürliches Vorkommen und künstliche Erzeugung*, Hygienische Rundschau, 1891, pag. 653.

Comunque sia, il fatto dell'azione chemiotassica, che le diverse sostanze esercitano sui leucociti e sulla fagocitosi, è altamente interessante pel problema della guarigione delle malattie infettive e dell'immunità.

L'altra teoria, di cui ci resta a parlare, è quella che ritiene che nella lotta contro i microrganismi entri in giuoco essenzialmente l'azione di sostanze chimiche, esistenti nel sangue e nel succo dei tessuti.

Una tale teoria è basata sul fatto osservato prima da Fodor (1), e confermato poscia con numerose osservazioni da Nuttal (2), da Petruschky (3), da Buchner (4) e da Behring e Nissen (5) che i liquidi dell'organismo, e specialmente il sangue, possiedono la proprietà di distruggere i microbi, all'infuori del concorso di qualsiasi elemento cellulare.

L'azione microbicida del sangue spetta essenzialmente al siero e non ai componenti morfologici: anzi la presenza di questi serve a fornire materiali nutritivi che aiutano lo sviluppo dei microrganismi. Difatti, facendo congelare e disgelare il sangue tale quale, questo diventa un buon terreno di nutrizione per quei microrganismi, verso i quali il siero dello stesso sangue, anche sottoposto all'azione del congelamento, conserva sempre una possente azione distruggitrice (Buchner).

Questa azione microbicida è stata osservata non soltanto nel sangue estratto dall'organismo, ma anche nel sangue circolante; poche ore dopo estratto, invece, il sangue perde questa sua proprietà, e diventa un terreno adatto per lo sviluppo dei microrganismi.

Lo stesso avviene per opera della temperatura elevata (50-55°C.) e della dialisi.

Quest'ultimo fatto ha condotto Buchner ad ammettere, che la causa della perdita del potere microbicida del siero sanguigno dializzato dipenda dalla mancanza dei composti salini, i quali però eserciterebbero colla loro assenza un'azione indiretta, alterando la struttura normale degli albuminoidi del siero attivo. Cosicchè il vero agente del potere microbicida sarebbe rappresentato dalle sostanze albuminoidi (*alessine* di Buchner), senza potere però precisare finora niente di più.

(1) Fodor, *Die Fähigkeit des Blutes Bacterien zu vernichten*, Deutsche med. Wochenschr. N 34, 1887.

(2) Nuttal, *Lavoro citato*.

(3) Petruschky, *Die Einwirkungen des lebenden Froschkörpers auf den Milzbrandbacillus*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 7, p. 75, 1889.

(4) Buchner, *Ueber die bacterientödtende Wirkung des zellenfreien Blutserums*, Centralbl. f. Bacter., Vol. 5, p. 817 e Vol 6, p. 1, 1889.

(5) Behring u. Nissen, *Ueber bacterienfeindliche Eigenschaften verschiedener Blutserumarten, Ein Beitrag Zur Immunitätsfrage*. Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 8, p. 412, 1890.

Una tale proprietà che il siero di sangue ha comune coll'umore acqueo, col liquido dell'ascite e dell'idrocele, coll'orina, col siero del pus e col latte (Fodor (1)), si esercita però su certe specie di microrganismi e su altre no, ed è diversa a seconda delle diverse specie animali. Oltre a ciò, essa ha un limite ed è in rapporto colla quantità dei batterî messi a contatto col siero: il che è quanto dire che la distruzione si esercita soltanto fin quando il numero dei batterî non eccede una certa misura.

In quanto al rapporto che può avere l'attività microbicida dei liquidi organici col fenomeno dell'immunità, congenita ed acquisita, e della guarigione delle infezioni, non v'ha dubbio che si conoscono fatti ben dimostrati, i quali fanno vedere che la distruzione, o la impedita moltiplicazione nell'organismo animale dei batterî specifici di certe infezioni, può dipendere esclusivamente dall'azione inibitrice dei liquidi organici: ma non si può perciò, almeno finora, generalizzare questa idea per tutte le malattie infettive, giacchè per alcune sonvi pure dati sperimentali, che pare la contraddicano.

Così il cane, animale quasi refrattario al carbonchio, possiede un siero sanguigno che non ha alcun potere microbicida verso il bacillo specifico, mentre ha un tal potere il siero del coniglio, che normalmente è assai sensibile per l'infezione carbonchiosa.

D'altronde, però, il siero sanguigno delle cavie e dei topi, che sono pel carbonchio più sensibili del coniglio, non esercita alcuna azione sul bacillo carbonchioso; ed oltre a ciò il siero di animali resi immuni coll'innesto preventivo dimostra in molti casi un'azione nociva sui batterî specifici, assai più spiccata che il siero degli stessi animali normali.

Ma un fatto che, se confermato, avrebbe una grande importanza per la questione presente, è quello osservato da Ogata e Iasuhara (2), che cioè i bacilli del carbonchio, se non vengono uccisi dal siero sanguigno di animali naturalmente immuni (cane, ratto bianco e rana), perdono però per opera di questo il potere patogeno (attenuazione).

Del resto non bisogna mai dimenticare che le cose si passano nell'organismo animale spesso assai diversamente che nelle esperienze fatte *in vitro*, cosicchè non è da meravigliare che esista talvolta divergenza fra i risultati di queste, e ciò che si osserva nell'organismo, dove non soltanto il sangue, ma anche gli altri liquidi organici possono entrare in azione nella lotta contro i microbi.

(1) Fodor, *Ueber bacterienvernichtende Eigenschaften der Milch*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 9, p. 41. 1890.

(2) Löffler, *Neuere Arbeiten über Immunisirungs-bebzw. Heilungsversuche bei Thieren gegenüber der Infection mit Milzbrand-, Tetanus-und Diphterie-Bacillen.* Centralblatt f. Bakteriologie, Vol. IX, N. 1 e 2, 1891.

Finalmente, in quanto all'importanza che possono avere i liquidi organici nel meccanismo dell'immunità, dobbiamo ancora accennare ad un altro ordine di fatti, altrettanto interessante che l' azione microbicida, e questo è l'azione *antitossica*, ossia distruggitrice dei veleni prodotti dai batterî, dimostrata per certe infezioni nel siero sanguigno negli animali resi immuni.

Questo fatto è stato messo in evidenza da Behring e Kitasato (1) pel tetano e per la difterite.

Tizzoni e Cattani (2) hanno anche precipitato dal siero di animali resi immuni pel tetano la sostanza dotata di potere antitossico (antitossina del tetano), la quale non esiste nel siero degli animali naturalmente immuni, e si dimostra attiva, non soltanto al di fuori, ma anche entro l'organismo animale, nel quale può anche arrestare l'infezione tetanica già in corso.

Come si vede adunque, l'azione protettrice dei liquidi organici può esercitarsi in varie maniere, sia come azione antisettica verso i batterî specifici (distruggitrice od attenuante), sia come azione antitossica verso i loro prodotti. Cosicchè la teoria « chimica » dell'immunità, se non può finora venire generalizzata per tutte le infezioni, ha però un gran numero di fatti in appoggio, tanto che può l'azione dei liquidi dell' organismo considerarsi come il principale fattore dell'immunità e della guarigione delle infezioni, senza escludere con ciò che anche altri momenti (fagocitosi, ecc.) vi concorrano, ed in grado diverso a seconda delle diverse malattie.

12. Influenza degli agenti esterni fisici e chimici.

a) Azione della luce e dell'elettricità.

Credevasi in addietro che la *luce* non potesse esercitare molta influenza su tali esseri, i quali sono per la maggior parte sprovvisti di clorofilla; ma le ricerche sperimentali hanno provato che, se la luce diffusa è poco attiva, la luce solare diretta invece è un valido agente distruttore dei microrganismi, e serve, anche quando non li uccide, a modificarne notevolmente le proprietà biologiche.

(1) Behring u. Kitasato, *Ueber das Zustandekommen der Diphterieimmunität und der Tetanusimmunität bei Thieren*. Deutsche mel. Wochenschr. N. 49. 1890.

(2) Tizzoni e Cattani, *Sulle proprietà dell'antitossina del tetano*. Riforma medica, N. 102, 1891.

Downes e Blunt (1), Duclaux (2) e Arloing (3) hanno infatti dimostrato che alla luce solare spetta una grande importanza igienica, giacchè essa agisce, sia impedendo lo sviluppo, sia distruggendo la vitalità dei germi e sia attenuando la virulenza di quelli patogeni, a seconda che la sua azione si esplica totalmente, oppure in maniera incompleta.

La resistenza alla luce solare si è finora riconosciuta diversa, a seconda delle diverse specie di microrganismi (4), a seconda che essi si trovano nella forma vegetativa semplice o allo stato di spore, a seconda dello stato loro di umidità o di disseccamento, ed anche a seconda del mezzo di nutrizione.

In generale le spore sono più resistenti delle forme vegetative, e il disseccamento favorisce l'azione sterilizzante della luce solare. Il fatto osservato da Arloing, il quale aveva trovato che bastavano 2 ore di insolazione per togliere alle spore carbonchiose contenute nel brodo la facoltà di germinare, mentre i bacilli erano ancora viventi dopo 27-30 ore d'insolazione, è stato spiegato da Roux (5), il quale ha provato che le spore carbonchiose esposte al sole nel brodo non germogliano più, non perchè sieno morte, ma perchè il brodo è divenuto un terreno improprio alla loro germinazione, in causa delle modificazioni chimiche prodotte in esso dalla luce solare.

Quest'azione della luce si deve probabilmente in gran parte al maggior potere ossidante che acquista sotto la sua influenza l'ossigeno atmosferico. Tanto Roux, come Gaillard (6) e Momont (7) hanno infatti osservato che i microrganismi e le spore vengono uccisi assai più rapidamente in presenza dell'aria, che lungi da questa. Siccome però anche in quest'ultimo caso avviene la distruzione dei microbi, così bisogna ammettere che l'ossigeno aiuti bensì l'azione della luce solare, ma che anch' essa come tale eserciti un' azione microbicida.

Invece non può ammettersi che quest'azione sia dovuta principalmente ai raggi calorifici della luce, come vorrebbero alcuni,

(1) Downes e Blunt, *Researches on the effect of light upon bacteria,* ecc, Proceedings of the Royal Society, 1877 e 1878.

(2) Duclaux. Acad. des Sciences, 12 Janv. 1885 e Soc. de Biologie, 25 Juil. 1885. Annales de l'Institut Pasteur, N. 2, 1887.

(3) Arloing, *Influence de la lumière*, ecc. Arch. de Phys., 1886.

(4) Pansini, *Azione della luce solare sui microrganismi*, Rivista d'igiene, 1889.

(5) Roux, *De l'action de la lumière et de l'air sur les spores de la bacteridie du charbon*, Annales de l'Institut Pasteur, N. 9, 1887.

6) Gaillard, *De l'influence de la lumière sur les microrganismes*, Lyon, 1888.

(7) Momont, *Action de la dessiccation, de l'air et de la lumière sur la bacteridie charbonneuse*, Annales de l'Institut Pasteur, 1892, N. 1.

perchè il grado di calore dei raggi solari non è sufficiente a spiegarci quei fatti, ed anche perchè l' esperienza diretta ha provato che, privando la luce dei suoi raggi calorifici, essa esercita pur sempre un'influenza nociva sulla vita dei microrganismi.

Ricordiamo a questo riguardo le osservazioni di Geisler (1), il quale ha provato che tutti quanti i raggi che compongono la luce, luminosi, chimici e calorifici, sono in grado di esercitare una azione nociva sui batterî.

Anche la luce elettrica (1000 candele) esercita la stessa azione di quella solare, soltanto in grado minore; e quanto all'azione dei diversi raggi dello spettro, i raggi rossi si dimostrano meno attivi, e più attivi di tutti invece quelli violetti e ultra violetti, come avevano già osservato Downes e Blunt.

Aggiungiamo infine che il fatto osservato da Roux per il brodo, il quale resta alterato nella sua composizione chimica per opera della luce solare diretta, è stato confermato da Geisler anche per la gelatina esposta alla luce.

Oltre che sulla vita e sul potere patogenico, la luce ha pure influenza sul movimento dei microrganismi, come ha provato Engelmann nel suo *bacterium photometricum*; mentre invece, secondo le osservazioni fatte finora, non pare che eserciti un' azione notevole sulla produzione di pigmento nelle specie cromogene, giacchè queste manifestano il loro potere colorante tanto alla luce come all'oscuro. La luce solare diretta produce bensì una specie di attenuazione di quel potere, ritardando la produzione del pigmento.

Riguardo all'azione dell'*elettricità*, si hanno finora pochi dati in proposito.

Cohn e Mendelsohn, sperimentando colla corrente galvanica, hanno visto che soltanto correnti elettriche molto forti possono agire distruggendo la vitalità dei microrganismi. La loro azione pare dovuta ai cambiamenti chimici prodotti nel liquido dall'elettricità, piuttosto che alla corrente come tale, giacchè Apostoli e Laguerrière (2) hanno trovato che l' azione microbicida della corrente costante sul bacillo del carbonchio spetta soltanto al polo positivo, in causa degli acidi e dell'ossigeno libero che esso sviluppa.

La corrente indotta invece, secondo Spilker e Gottstein (3),

(1) Geisler, *Zur Frage über die Wirkung des Lichtes auf Bacterien*, Centralblatt f. Bakteriologie, Vol. XI, 1892, pag. 161.

(2) Apostoli u. Laguerriere, *Ueber die Wirkung des positiven Pols des constanten Stromes auf die Mikroorganismen, besonders die Milzbrandbacillen*, Berl. klin. Wochenschr. N. 22, 1890.

(3) Spilker u. Gottstein, *Ueber die Vernichtung von Mikroorganismen durch die Induktionselektricität*, Centralblatt für Bakteriologie, Vol IX, N. 3-4, 181.

può uccidere i microrganismi nell'acqua, indipendentemente da qualsiasi azione secondaria del calore o dell'elettrolisi. L' azione della corrente indotta sarebbe soltanto in rapporto coll'energia della corrente, colla durata e col movimento.

b) Azione della pressione e del movimento.

I cambiamenti di pressione dell'aria non esercitano un'azione sensibile sulla vita e sullo sviluppo dei microrganismi, se non quando raggiungono un grado molto notevole.

Difatti l'aria compressa a 450-500 atmosfere, secondo le esperienze di Certes (1), non serve ad arrestare la decomposizione dei liquidi putrefatti; mentre, secondo Regnard (2), sotto una pressione di 6-700 atmosfere le sostanze putrescibili (carne, orina, latte, ecc.), si mantengono inalterate per parecchie setttimane.

Quest'influenza inibitrice della pressione sullo sviluppo dei microrganismi devesi probabilmente attribuire all'ossigeno atmosferico. Difatti Bert (3) ha dimostrato che l'ossigeno compresso a 8-10 atmosfere arresta digià i fenomeni della fermentazione e della putrefazione e che, sotto una pressione maggiore, uccide addirittura i germi viventi.

Anche Chauveau (4) ha provato lo stesso fatto pel bacillo carbonchioso, ed ha trovato inoltre che questo, prima di morire, perde a poco a poco la sua virulenza.

Riguardo all' influenza del *movimento* sullo sviluppo e sulla vita dei batterî, nulla si può dire ancora di preciso, giacchè i risultati delle esperienze fatte finora sono fra loro contradittorî.

Pei microrganismi contenuti nelle acque si ritiene in generale che la quiete favorisca il loro sviluppo, e che perciò nei pozzi e nelle cisterne i germi patogeni possano svilupparsi più facilmente che nelle acque correnti. Non è però ancora deciso se si debba veramente alla mancanza di movimento, oppure ad altre cagioni il fatto del maggior contenuto di batterî che si trova in generale nelle acque stagnanti.

(1) Certes, *De l'action des hautes pressions sur les phénomènes de putrefaction* Compt. Rend. Acad. des Sciences, Vol. II.

(2) Regnard, Société de Biologie, Séance du 16 Fevrier 1889.

(3) Bert, *Oxigène comprimé*, Compt. Rend Acad. des Sciences, Vol. 80 e 84.

(4) Chauveau, *De l'attenuation des cultures virulentes par l'oxygène comprimé*, Comptes rendus Acad. des Sciences, 1884 e 1885.

c) **Azione della temperatura.**

La temperatura esercita una grande influenza sullo sviluppo e sulla vita dei microrganismi. In generale può dirsi che un certo grado di calore, piuttosto elevato, favorisce il loro sviluppo, e che una temperatura bassa lo ritarda. L'influenza della temperatura è molto diversa però a seconda delle diverse specie di microrganismi, ed anche a seconda di altre condizioni, specialmente secondo la composizione del substrato materiale che li alimenta.

Per ciascuna specie di batterî havvi un grado *ottimo* di temperatura, che è il più favorevole pel loro sviluppo e che per quelli patogeni è di circa 37° C., mentre per gli altri è per lo più di 20-24° C. Oltre a questo grado ottimo, se ne distingue anche uno *massimo* e un altro *minimo*, fino ai quali è possibile ancora lo sviluppo, facendosi però questo sempre più stentato, a mano a mano che dal grado ottimo si va verso i due estremi.

Ve ne ha alcuni, fra quelli patogeni, pei quali la temperatura nella quale è possibile lo sviluppo oscilla entro limiti ristrettissimi. Così il bacillo della tubercolosi non vegeta bene che a 37° C., e bastano piccole oscillazioni, anche di un mezzo grado al disopra o al disotto, per ritardarne notevolmente lo sviluppo.

In generale lo sviluppo di batterî patogeni non è possibile che fra 10° e 40° C.; mentre invece si conoscono molte specie saprofitiche, che si sviluppano a temperature che oltrepassano i limiti ora accennati. Così Miquel (1) ha descritto una forma di bacillo, coltivato dall'acqua delle cloache, che vegeta bene a 70° C.; Globig (2) ne ha trovate nel terreno parecchie specie che si sviluppano fra 50° e 70° C., e Fischer (3) dall'acqua del mare e dal terreno ha coltivato microbi, alcuni dei quali fosforescenti, che si sviluppano a 0° C.

Di tali fatti il primo specialmente non ha soltanto un'importanza biologica, ma riceve anche un'applicazione pratica nella sterilizzazione delle sostanze nutritive fortemente albuminose, come si dirà meglio in seguito a proposito della sterilizzazione discontinua del siero di sangue.

I due gradi estremi fra i quali oscilla la temperatura compatibile collo sviluppo dei batterî, che col linguaggio ordinario chia-

(1) Miquel, *Monographie d'un bacille vivant au-delà de* 70° *centigrades*, Annales de Micrographie, N. 1, 1888.

(2) Globig, *Ueber Bacterien-Wachstum bei* 50° bis 70°, Zeitschr. f. Hygiene, 1888, p. 294.

(3) Fischer, *Bakterien-Wachstum bei* 0° C. ecc., Rif. nel Centralbl. f. Bakteriologie, 1888, p. 89.

meremo di *caldo* e di *freddo*, sospendono le manifestazioni vitali dei microrganismi, ma non valgono ancora a spegnerne la vita, poichè, se si ripristinano di nuovo le condizioni opportune, ricompaiono tosto anche i fenomeni vitali. Al di là di questi limiti estremi cessa però anche la vita. E qui è necessario ricordare un duplice fatto, molto importante per la pratica delle disinfezioni, ed è che anzitutto è diverso il grado di temperatura (parliamo ora soltanto di temperatura elevata, perchè è la sola che si adoperi in pratica) necessario ad uccidere le diverse specie di microparassiti, ed in secondo luogo che per una stessa specie varia assai il grado di temperatura microbicida, a seconda che si tratta della forma vegetativa semplice oppure di spore, giacchè queste sono sempre assai più resistenti.

Così, ad es., i bacilli del tifo e quelli del colèra sono uccisi in breve tempo da una temperatura di 60° C., quello della tubercolosi, nello stesso tempo, non muore che ad una temperatura di circa 70°, e lo stafilococco aureo a 80° C.

Il freddo viene sopportato anche meglio dai microrganismi. Il semplice congelamento dell'acqua comune non serve che a distruggere una parte dei microbi che essa contiene, mentre il congelamento e il disgelo, parecchie volte ripetuti, esercitano un' azione distruggitrice più spiccata (Prudden). Per avere dal freddo una azione microbicida completa, bisogna raggiungere temperature di parecchi gradi sotto lo zero.

Come si è detto, le spore offrono al calore una resistenza molto maggiore che le forme vegetative semplici. Delle specie patogene conosciute, il bacillo del carbonchio è quello che offre le spore più resistenti. Nell' aria secca resistono fino 140° C., e nella corrente di vapor d'acqua a 100° C. possono resistere anche 10-12 minuti. Bisogna badare però, che anche le spore di una stessa specie batterica possono offrire un grado diverso di resistenza a seconda della loro provenienza, come ha dimostrato Esmarch (1) per quelle del bacillo carbonchioso.

Le spore più resistenti che si conoscono sono quelle dei così detti « bacilli delle patate », che non sono patogeni e si trovano abbondanti specialmente nel terreno. Globig (2) ha trovato che le spore di una varietà rossa di quei bacilli resistono per 6 ore alla corrente di vapor d'acqua a 100° C., per mezz' ora all' azione del

(1) Esmarch, *Die Milzbrandsporen als Testobject bei Prüfung von Desinficientien*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. V, 1889, p. 67.

(2) Globig, *Ueber einen Kartoffel-Bacillus mit ungewöhnlich widerstandfähigen Sporen*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 3, 1888, p. 322.

vapor d'acqua saturo soprariscaldato a 115°, e per 2 minuti allo stesso vapore a 127° C.

Nello sterilizzare che faceva, per studi speciali, la polenta cotta di farina di granturco, ho anch'io osservato che le spore di una varietà grigia degli stessi bacilli, che si trovano d'ordinario nella farina di mais, resistono per più di un'ora all'azione del vapor d'acqua saturo soprariscaldato a 115° C.

È interessante notare il fatto, che le spore resistono molto di più all'azione del calore secco, che non a quella del calore umido sotto forma di vapor d'acqua. Si è già visto nell'esempio sopra citato delle spore del bacillo carbonchioso, qual differenza notevole esista fra il grado di temperatura secca e quello di calore umido necessarî a produrne la morte. Questa differenza si può spiegare per ciò, che la membrana che avvolge la spora viene rammollita dal vapore acqueo e si lascia così più facilmente penetrare dal calore.

L'azione della temperatura non solo si fa risentire sullo sviluppo e sulla vitalità dei microrganismi, ma è in grado anche di modificarne talora le proprietà biologiche, senza influire sensibilmente sul loro sviluppo.

Uno degli esempi più spiccati di ciò l'abbiamo nell'attenuazione che subisce il potere patogeno del bacillo carbonchioso, coltivato a 42° C., mentre lo sviluppo è sempre abbondante. E così il micrococco prodigioso, coltivato a 37° C., cresce abbondantemente, ma non produce più la sostanza colorante e la trimetilamina, e le produce invece, se coltivato alla temperatura ordinaria dell'ambiente.

Ricordiamo infine l'azione notevole che la temperatura esercita sulla produzione delle spore e sulla loro germinazione, sulla comparsa delle ciglia e sulla forma dei microrganismi.

Sono queste particolarità che bisogna conoscere esattamente, sia per la coltivazione artificiale dei batterî, sia per l'applicazione del calore come disinfettante degli strumenti batteriologici e degli oggetti inquinati da germi patogeni.

d) **Azione del disseccamento.**

I microrganismi esposti all'aria hanno bisogno di un certo grado di umidità per conservarsi in vita. Anche pel disseccamento, come per la temperatura, l'influenza è di grado diverso secondo il mezzo in cui si sono sviluppati e secondo che si tratta di batterî non sporigeni o di spore. Queste ultime resistono molto di più all'azione del disseccamento e possono all'asciutto conservarsi vitali

anche per anni. Le forme non sporigene poi resistono al disseccamento per un tempo variabile, a seconda della maggiore o minore facilità con cui il protoplasma cellulare perde l'acqua che contiene. I micrococchi, specialmente se riuniti in forma di zooglea, resistono più a lungo alla mancanza di umidità; ciò forse accade per l'azione protettrice della sostanza gelatinosa che li avvolge, inspessita dall'essiccamento.

Il disseccamento serve anche ad attenuare il potere patogeno di certi virus, come ha trovato Pasteur pel virus rabbico contenuto allo stato di purezza nel midollo spinale degli animali rabbiosi. Esso serve quindi come aiuto potente della luce solare e dell'ossigeno nella distruzione e nell'attenuazione naturale dei batterî nel mondo esterno.

e) **Azione dei gas.**

Quanto all'azione dei gas, si è già avuto più volte occasione di accennare all'influenza notevole che ha l'ossigeno atmosferico sullo sviluppo, sulle proprietà biologiche e sulla vitalità dei microrganismi. Senza ripetere ciò che si è già esposto, aggiungiamo soltanto che sulla mobilità dei batterî l'ossigeno ha un'azione diversa a seconda che si tratta di batterî aerobî od anaerobî. I primi infatti manifestano i loro movimenti in presenza di quel gas, mentre pei secondi basta di esso una piccola traccia per farli cessare. Oltre a ciò in un'atmosfera di O puro, ad eccezione degli anaerobi assoluti, gli altri vegetano con maggior rapidità che nell'aria atmosferica.

L'ozono invece, secondo le osservazioni di Wissokowitsch (1), non farebbe che ritardare lo sviluppo dei batterî patogeni, mentre secondo quelle di Sonntag (2), avrebbe su essi anche un'azione distruggitrice, disinfettante.

Oltre l'O, anche altri gas esercitano un'azione sulla vita e sullo sviluppo dei microrganismi, importante a conoscersi specialmente per l'applicazione che alcuni di essi hanno ricevuto per le culture anaerobiche.

Riguardo all'anidride carbonica, le osservazioni di Fränkel (3) hanno dimostrato che, mentre alcuni batterî possono ve-

(1) Wyssokowitsch, *Die Wirkung des Ozons auf das Vachsthum der Bakterien*, Centralblatt f. Bakteriologie, Vol. 5, 1889, pag. 715.

(2) Sonntag, *Ueber die Bedeutung des Ozons als Desinfiziens*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 8, 1890, p. 95.

(3) Fränkel, *Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebensthätigkeit der Mikroorganismen*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 5, 1889, pag. 332.

getare in un' atmosfera pura di CO^2 quasi come nell' aria, altri invece vi crescono stentatamente, ed altri infine o non si sviluppano, pur conservandosi vitali, oppure muoiono addirittura (bacillo del colèra e del carbonchio). Questo gas adunque è tutt'altro che indifferente pei microrganismi, e non è quindi da raccomandarsi per le culture degli anaerobî.

Secondo le ricerche di Frankland (1), fatte però su di un numero limitato di microrganismi, l' idrogeno non esercita azione alcuna apprezzabile sul loro sviluppo. L'ossido di carbonio invece impedisce lo sviluppo di certe forme, come il protossido d' azoto. Altri gas poi, come l'anidride solforosa, l'idrogeno solforato e il biossido d'azoto, sono addirittura deleterî per molti microrganismi.

f) Azione dei reagenti chimici. Antisepsi e disinfezione.

Si è visto come gli stessi prodotti del ricambio materiale dei microrganismi, ad un certo grado di concentrazione, esercitano su di essi un' azione nociva ed impediscono l' ulteriore loro sviluppo nei mezzi di cultura. Oltre a queste sostanze, evvi una serie molto estesa di composti chimici, i quali agiscono come veleni sui batteri, e valgono ad impedirne lo sviluppo, oppure a distruggerne la vita, a seconda della durata della loro azione e del grado di concentrazione in cui si trovano. Questi corpi si distinguono col nome di « *antisettici* » o di « *disinfettanti* », secondochè appunto la loro azione si limita allo impedire lo sviluppo, oppure uccide addirittura i microrganismi. Il loro modo di agire è adunque consono con quello della temperatura, e al pari di questo si esercita diversamente sulle varie specie batteriche, e in modo diverso sulle spore e sulle forme vegetative semplici.

Lo studio di queste sostanze è della più alta importanza per l'igiene, e dopo l'indirizzo veramente scientifico che esso ebbe per opera delle ricerche di Koch (2), ha acquistato in breve una grande estensione; tanto che qui non possiamo che accennare le norme generali relative ai metodi di ricerca, e le principali sostanze, le quali esercitano più spiccata l'azione antisettica e disinfettante, e che sono per ciò di uso comune nella pratica delle disinfezioni.

Il problema della disinfezione per opera degli agenti chimici in pratica consiste nell' applicazione di una sostanza, la quale

(1) Frankland, *Ueber den Einfluss der Kohlensäure und anderer Gase auf die Entwickelungsfähigkeit der Mikroorganismen*, Zeitschr. f. Hygiene Vol. 6, 1889, pag. 13.

(2) Koch, *Ueber Desinfection*, Mittheil. a. d. kais. Gesundheitsamte, Vol. I, 1881.

sia capace di uccidere i batterî (qui parliamo soltanto di quelli patogeni) e le loro spore, quando esistono.

Noi dobbiamo adunque anzitutto, quando si voglia stabilire il potere disinfettante di una qualche sostanza, provare la sua azione e sulle forme vegetative semplici e su quelle sporigene dei batterî patogeni. Sotto questo riguardo, oggidì che sono noti la maggior parte dei batterî specifici delle malattie infettive, possiamo procedere più razionalmente di prima nella scelta dei disinfettanti; giacchè, mentre allorquando comparve il lavoro classico di Koch (1881), essendo ignoti la maggior parte degli agenti specifici delle infezioni, non potevansi accettare per la pratica se non quei disinfettanti, i quali si mostravano attivi sulle forme patogene più resistenti, le spore del carbonchio, ora invece possiamo adottare per ogni singola malattia quelle sostanze che si mostrano sicuramente attive nel distruggere il relativo microbio specifico. E questo non è di poco vantaggio per la pratica, poichè molti batterî patogeni, quelli cocciformi anzitutto, e fra i bacilli quello del colèra, del tifo e della difterite, non sono sporigeni, e possiamo quindi distruggerli con sostanze meno costose e meno pericolose di altre, che hanno un potere disinfettante maggiore.

Nell'eseguire lo studio dell'azione disinfettante di una data sostanza è necessario por mente a certe condizioni dell'esperienza, le quali possono variarne di molto i risultati, e che bisogna quindi conoscere esattamente, se si vogliono evitare gli errori.

La prima e fondamentale avvertenza che devesi avere, è quella di stabilire in maniera non dubbia che si è raggiunto lo scopo della ricerca, ossia la morte dei batterî sui quali si esperimenta.

Questa certezza si ottiene per una duplice via: sia provando se quelli sono ancora capaci di sviluppo nei mezzi ordinarî di nutrizione, sia vedendo se sono ancora attivi negli animali sensibili per l'infezione.

All'una e all'altra di queste prove però vanno unite cause d'errore. Nella prima può accadere il fatto, che piccole quantità del disinfettante vengano trasportate nell'atto dell'innesto insieme coi batterî e servano poscia ad impedire il loro sviluppo nei mezzi di nutrizione; il che può avvenire tanto più facilmente, in quanto che Geppert (1) ha dimostrato che pei batterî sui quali si è già fatto agire un disinfettante, senza però produrne la morte, bastano poi per impedirne lo sviluppo quantità del disinfettante molto più piccole, che per gli stessi batterî in condizioni normali.

(1) Geppert, *Zur Lehre von den Antisepticis*. Berl. klin. Woch. 1889, N. 36 e 1890, N 11.

Egli è perciò che, ad evitare quella causa d'errore, si consiglia generalmente o di diluire il materiale d'innesto in una grande quantità di materiale nutritivo, oppure di lavare accuratamente con acqua sterilizzata i fili o la carta a cui sono aderenti i microrganismi. In certi casi però neppure ciò è sufficiente, ed è necessario allora neutralizzare il disinfettante con speciali mezzi chimici, come è il caso di fare allorquando si istituiscono ricerche col sublimato corrosivo, giacchè il sublimato aderisce così tenacemente ai batterî sui quali si fa l'esperimento, che nè l'acqua, nè l'alcool valgono a portarlo via in maniera completa. È necessario far precipitare il mercurio sotto forma di solfuro, trattando i fili coll'acido solfidrico, o col solfuro d'ammonio.

Si è trovato infatti che le spore del bacillo carbonchioso, tenute per mezz'ora nella soluzione di sublimato all'1 $^0/_{00}$ e lavate poscia come d'ordinario, trasportate in gelatina non sono suscettibili di sviluppo; ma se invece, prima di portarle in gelatina, si trattano coi reagenti suddetti, si vede che germogliano ancora; segno evidente che non erano morte, ma che quella piccolissima quantità di sublimato, rimasta aderente dopo il lavamento, aveva bastato ad impedire il loro sviluppo.

Si è detto che un altro mezzo per verificare l'effetto dei disinfettanti è quello dell'innesto negli animali, fatto col materiale su cui ha agito il disinfettante. Questa prova però, oltre che è applicabile soltanto per quei batterî che sono patogeni anche per gli ordinarî animali da esperienza, porta con sè una notevole causa d'errore; e questa dipende da ciò che l'azione dei disinfettanti, allorquando non è completa da produrre la morte dei microparassiti, ne può bensì produrre l'attenuazione. Cosicchè la capacità di sviluppo nei mezzi di nutrizione, tolte le cause d'errore sopra accennate, resta sempre il reagente più delicato che abbiamo per verificare l'azione di un disinfettante. La prova dell'innesto negli animali può servire soltanto, e in certi casi, di controllo alla prima.

Un secondo momento importante per tali esperienze è quello della composizione chimica del mezzo, nel quale si trovano i batterî che devono essere uccisi, giacchè l'azione di un disinfettante si esercita diversamente nei mezzi di diversa composizione chimica.

Behring (1) ha provato che il sublimato corrosivo in proporzione di 1 : 500000 uccide in pochi minuti i bacilli del carbonchio sospesi nell'acqua, mentre per ottenere nello stesso tempo la morte di essi nel brodo, è necessaria una proporzione di sublimato di 1 : 40000,

(1) Behring, *Ueber Desinfection, Desinfectionsmittel und Desinfectionsmethoden*, Zeitschr. f. Hygiene. Vol. 9, 1890, p. 395.

e nel siero di sangue di 1 : 2000. Nei liquidi albuminosi adunque il sublimato esercita un potere disinfettante molto più debole, che nei liquidi privi di albumina; e ciò perchè esso precipita sotto forma di albuminato mercurico, il quale, se viene disciolto in un eccesso di liquido albuminoso, riesce anch'esso microbicida, ma altrimenti il precipitato impedisce meccanicamente la penetrazione del disinfettante e quindi la sua azione. Un tale inconveniente si può evitare mediante l'aggiunta del cloruro sodico o potassico, in proporzione di 5 parti di sale per una di sublimato, oppure coll'aggiunta dell'acido cloridrico o tartarico in proporzione del 5 per mille. L'aggiunta di tali sostanze ha anche il vantaggio di conservare più a lungo inalterata ed attiva la soluzione di sublimato, e di far sì che questa possa, senz' alcuno inconveniente, prepararsi coll'acqua comune (non distillata), semplicemente bollita.

Altri momenti da tenersi in conto nelle esperienze sui disinfettanti sono la durata dell'azione, la temperatura del mezzo e il numero dei microrganismi.

Per ottenere l'azione microbicida in un tempo breve, è necessario aumentare in proporzione la quantità del disinfettante; mentre invece, quanto minore è il numero dei batterî, tante più piccola è pure, a parità di condizioni, la quantità del disinfettante sufficiente a distruggerli. La temperatura elevata poi favorisce ed aumenta in modo notevole il potere disinfettante delle sostanze chimiche. Così, ad es., mentre a 36° C. è sufficiente una proporzione di sublimato di 1 : 100000 ad uccidere in 5 minuti i bacilli del carbonchio, a (3° C.), è necessaria una proporzione di 1 : 25000.

La temperatura esercita invece un'azione inversa sul potere *antisettico* delle stesse sostanze, almeno per ciò che riguarda l'azione loro sui batterî patogeni, i quali trovano condizioni più favorevoli pel loro sviluppo a temperatura elevata (37° C.), che non a bassa temperatura. Di questo fatto ci gioviamo allorquando si prova colle culture l'azione di un disinfettante, tenendo queste nel termostato perchè possano i batteri vincere meglio l' azione inibitrice dello sviluppo, che potrebbero esercitare quelle traccie del disinfettante, trasportate con essi nel fare l'innesto.

Finalmente è da notare che è diversa l'azione dei disinfettanti secondo le diverse specie batteriche, e per una stessa specie, a seconda che si trova nella forma vegetativa o in quella di spora, e secondo il grado di virulenza che possiede.

Per dare un'idea del grado diverso di resistenza ai disinfettanti dei varî microparassiti, dirò che per uccidere nello stesso tempo i bacilli del tifo e del moccio è necessaria una quantità doppia di sublimato che pei bacilli del colèra, della difterite

e del carbonchio, e per lo stafilococco aureo una quantità trenta volte maggiore. Molto più spiccata è poi la differenza a seconda che si tratta di bacilli o di spore. Così il sublimato in proporzione di 1 : 60000 uccide i bacilli del carbonchio nel brodo in 2 ore, mentre le spore resistono per 3 ore nel sublimato all' 1 : 1000.

Un fatto da tenersi a mente, a riguardo delle spore del bacillo del carbonchio, è quello posto in chiaro da Esmarch e già altra volta accennato, che i grado loro di resistenza può essere molto diverso a seconda della loro provenienza. Difatti, mentre Koch aveva osservato che le spore del carbonchio muoiono dopo due giorni nella soluzione di acido fenico al 5 %, Fränkel ha visto spore dello stesso bacillo resistere per oltre 40 giorni nella stessa soluzione.

Finalmente è diverso il grado di resistenza dei batterî patogeni, a seconda che sono completamente attivi, oppure attenuati. Come hanno dimostrato Flügge e i suoi scolari (1), i batterî attenuati resistono assai meno all'azione dei disinfettanti, cosicchè non bisogna mai dimenticare, nel fare le esperienze su di una data specie batterica, di provarne prima il grado di virulenza.

Tutte queste, a cui ho accennato finora, sembrano piccole avvertenze, ma bisogna di esse tener conto esattamente nelle esperienze dei disinfettanti, se si vuole da queste trarre un risultato di qualche valore. L'essere infatti alcuni di quei momenti conosciuti soltanto da poco tempo ci spiega le differenze, talvolta enormi, dei risultati ottenuti per lo addietro colle stesse sostanze da diversi sperimentatori.

Riassumendo, il metodo *generale* di esperimento per provare l'azione disinfettante è il seguente: *sottoporre all'azione di una data sostanza i microrganismi patogeni, in cultura pura, previa constatazione del loro grado di virulenza; togliere da essi qualsiasi traccia del disinfettante, seminarli in un mezzo adatto di nutrizione, o inocularli negli animali, fare in pari tempo, per controllo, culture degli stessi batterî in condizioni normali, e finalmente esaminare i risultati delle seminagioni, non solo dal punto di vista della possibilità di sviluppo, ma anche da quello della sua rapidità e della virulenza del prodotto delle culture.* Oltre a ciò, prima di farne l'applicazione pratica, bisogna anche provare se quella sostanza è in grado di distruggere gli agenti infettivi nelle condizioni in cui essi si trovano in natura, vale a dire negli escrementi, negli sputi, negli oggetti di vestiario. Basta ricordare per ciò l'esempio sopra citato del sublimato corrosivo, il quale per i motivi già esposti non può essere applicato, ad es., per la disinfezione degli sputi dei tisici, nè per quella delle feci.

(1) Zeitschr. f. Hygiene, Vol. IV, 1888.

I metodi *speciali* di ricerca dell' azione disinfettante si riducono a due.

1.° Si prendono culture fatte nel brodo, o nel siero di sangue liquido, vi si aggiungono quantità percentuali determinate del disinfettante, e dopo un dato tempo, dopo alcuni secondi o minuti, o dopo qualche ora, se ne prende una piccola quantità coll'ansa di platino, e si semina nel mezzo di nutrizione più adatto allo sviluppo di quel microrganismo, mantenendo la cultura al grado di temperatura ottima pel suo sviluppo.

Oppure si pongono nei tubi da saggio quantità determinate (10 cc.) di soluzioni del disinfettante, a vario titolo, vi si mescola un dato numero di goccie di una cultura liquida precedentemente agitata, si agitano bene i tubi, e di quando in quando se ne fanno culture, come si è detto. In pari tempo si fanno anche per controllo culture cogli stessi microrganismi non sottoposti ad alcun trattamento.

In generale si usa per le culture la gelatina liquefatta a 25-30° C., contenuta nella solita quantità di 10 cc. nei tubi da saggio, nei quali si distribuisce accuratamente il materiale d'innesto; e ciò per eliminare, per quanto si può, la causa d'errore principale inerente a un tal metodo, che è quella di trasportare insieme coi microrganismi una certa quantità della sostanza disinfettante, che può impedire il loro sviluppo, quando non si può togliere addirittura un tale inconveniente, trasformando il disinfettante in un composto chimico indifferente.

Un tal metodo si usa di preferenza allorquando si fanno le esperienze sopra i batterî senza spore, giacchè alcuni di essi sono molto sensibili all'azione del disseccamento necessario per l'applicazione dell' altro metodo, del resto più esatto, che si adopera pel materiale sporigeno.

2.° L' altro metodo consiste nel prendere pezzi di filo di seta, oppure di carta bibula, sterilizzati, impregnarli di un' emulsione acquosa di spore, farli disseccare a moderato calore (20-25° C.), e sottoporli all' azione del disinfettante.

Quanto ai particolari di questo metodo, diremo anzitutto che, se si adopera il filo di seta, bisogna sceglierlo di media grossezza, tagliarlo in pezzi di circa un cm. di lunghezza, e sterilizzarli entro i comuni tubi da saggio nella corrente di vapor d'acqua. La sostituzione di questi con fili di asbesto o di cotone, proposta da alcuni, non realizza alcun notevole vantaggio. Invece, a mio avviso, le listerelle di carta bibula, larghe un cm. circa, sterilizzate entro tubi da saggio nell'aria secca a 150° C., sono da preferirsi ai fili di seta, sia perchè la carta, impregnandosi uniformemente coll'emulsione delle spore, permette una distribuzione loro più

uniforme sulla sua superficie, sia anche perchè essa si lascia penetrare dal disinfettante più facilmente e più uniformemente dei fili di seta.

Le spore si preparano tenendo le culture in agar o sulle patate entro il termostato fino a sporificazione completa, e stemperando poscia il materiale nell'acqua sterilizzata fino ad averne un'emulsione opaca. In questa si tengono immersi i fili di seta, o i pezzi di carta bibula, fino a completa impregnazione, e si pongono poscia a disseccare entro scatole di Petri sterilizzate, badando a che in tutte queste manipolazioni non si mescolino altri germi con quelli su cui si vuol fare l'esperienza, e tenendo il materiale lungi dall'azione della luce solare.

I fili di seta o i pezzi di carta disseccati si mettono a contatto colla soluzione disinfettante (10 cc.) entro scatole doppie di vetro e, dopo determinate frazioni di tempo, si prendono su con un ago di platino sterilizzato, e si lavano per 4-5 minuti nell'acqua sterilizzata tepida, oppure in una soluzione di solfuro di ammonio (1 : 3) se si tratta di sublimato. Dopo di ciò, si pongono entro tubi d'assaggio contenenti 10 cc. di brodo o di agar, e si tengono a 37° C. per osservare se avviene o no lo sviluppo, e con quali modalità esso si compie.

Dopo aver constatato coll' esperienza di laboratorio l' attività disinfettante di una data sostanza, un'ultima avvertenza da avere, prima di tradurre in pratica i dati sperimentali, è quella di provare l'azione venefica del disinfettante sull'organismo animale, sia perchè può essere pericoloso lasciare a disposizione del pubblico sostanze fortemente velenose, come sono pur troppo i disinfettanti più energici che noi conosciamo, sia perchè in certi casi, come è per la disinfezione delle ferite e delle piaghe, bisogna sapere evitare il pericolo di un avvelenamento.

Accenniamo qui brevemente le principali sostanze nelle quali si è positivamente riconosciuta un'azione energica, antisettica e disinfettante, e che si adoperano per ciò nella pratica delle disinfezioni.

A capolista di esse sta il *sublimato corrosivo*, il quale si adopera sciolto nell'acqua bollita, o in soluzione semplice, oppure coll'aggiunta di cloruro sodico, o di acido tartarico, o cloridrico, nelle proporzioni sopradette.

Il sublimato si adopera come disinfettante nelle proporzioni di 1 fino al 5 e 10 per mille, a seconda dei casi; a seconda, cioè, che si debba agire su materiale sporigeno o sui batterî senza spore, ed a seconda che questi si trovino mescolati o no con sostanze albuminoidi.

L'*acido fenico*, che si adopera in soluzione di 1 a 5 %, è l'altra sostanza che insieme col sublimato ha avuto un'applicazione pratica più estesa. Di questa sostanza bisogna dire però che, mentre è energica l'azione antisettica e quella disinfettante sulle forme vegetative dei batterî, è poco attiva invece sulle spore, avendo Fränkel dimostrato, come si è detto, che le spore del bacillo carbonchioso possono restare impunemente, per oltre 40 giorni, nella soluzione fenica al 5 %

L'azione disinfettante dell'acido fenico viene aumentata coll'aggiunta di altri acidi (cloridrico, solforico): se infatti all'acido fenico *greggio* del commercio si aggiunge un eguale volume di acido solforico (Laplace (1)), si ottiene un miscu-

(1) Laplace, *Ueber Schwefel-Carbolsäure als Desinfectionsmittel.* Deutsche med. Wochenschr. N. 7, 1888.

glio avente un potere microbicida notevolmente maggiore di quello dell'acido fenico puro. Questo fatto è dovuto a ciò che l'acido solforico rende solubili i cresoli (orto-meta-e para-cresolo) contenuti nell'acido fenico greggio, i quali sono poco o nulla solubili nell'acqua e posseggono un potere microbicida maggiore dell'acido fenico (Fränkel (1)).

Malgrado che l'acido fenico abbia un potere disinfettante cento volte, circa, minore del sublimato, tuttavia deve per certe sue proprietà essere talora ad esso preferito. Ciò succede, ad es., nella disinfezione degli strumenti chirurgici, giacchè li altera meno del sublimato, ed anche nella disinfezione degli escrementi e degli sputi, perchè non si altera in presenza degli albuminoidi.

Del resto l'acido fenico in proporzione dell' 1,5 % uccide in 1-2 minuti i bacilli del colèra, del carbonchio, del tifo, della difterite e del moccio, nonchè gli streptococchi piogeni, e in proporzione del 3 % uccide nello stesso tempo gli stafilococchi piogeni più resistenti.

È da notare inoltre che, se l'acido fenico è poco attivo sulle spore alla temperatura ordinaria, a 37° C. invece la soluzione a 5 % è capace di uccidere le spore del bacillo carbonchioso in 3 ore, e quella a 4 % in 4 ore.

A lato del sublimato e dell'acido fenico, merita pure di essere ricordato pel suo notevole potere disinfettante il *nitrato d'argento*, il quale nei liquidi albuminosi (latte, siero di sangue, ecc.) si addimostra persino superiore al sublimato: il suo prezzo elevato però e la sua facile alterabilità fanno sì che non possa avere che un'applicazione pratica limitata.

Non parliamo qui di altri sali metallici, perchè l'esperimento esatto li ha trovati sprovvisti di quel potere disinfettante notevole, che si era loro attribuito in addietro Tali sono ad es. il solfato di ferro e il solfato di zinco, i quali salirono in fama di disinfettanti semplicemente in virtù del loro potere deodorante.

A lato di questi va menzionato pure l'*acido borico*, il quale come disinfettante è pochissimo attivo, e tuttavia si adopera ancora, specialmente nella pratica ostetrica, per la sua relativa innocuità e pel suo discreto potere antisettico.

Altri corpi appartenenti alla serie aromatica, dei quali si è studiato di recente il potere disinfettante, e che sono stati anche introdotti nella pratica, sono la *creolina* e il *lisolo*.

Si trovano in commercio due qualità di creolina: quella della ditta G. Pearson, o *creolina inglese*, e un'altra della ditta Artmann, o *creolina tedesca*. Di quest'ultima è a dirsi soltanto che è stata trovata molto inferiore alla prima per potere disinfettante, e quindi non è da tenersi in conto. Nella creolina inglese, che è un miscuglio di varî corpi della serie aromatica, fra i quali più importanti alcuni fenoli (cresoli) e l'olio creolinico, è specialmente notevole il potere antisettico e deodorante, mentre l'azione sua disinfettante è inferiore a quella dell'acido fenico. È da notare inoltre che nei liquidi albuminosi perde molto della sua attività, come il sublimato. Nell'acqua (1-3 %) forma un'emulsione che presto si altera.

Il *lisolo*, che è una soluzione di fenoli in un sapone alcalino, secondo le ricerche di Schottelius (2) possederebbe un potere disinfettante notevolmente maggiore dell'acido fenico. Per mio conto invece, avendo anch'io sperimentato il lisolo sui micrococchi piogeni, posso confermare quanto asserisce Behring, che cioè l'azione disinfettante di questa sostanza non può dirsi superiore a quella dell'acido

(1) Fränkel, *Die desinficirende Eigenschaften der Kresole*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol 6, 1889, p. 521.

(2) Schottelius, *Vergleichende Untersuchungen über die desinficirende Wirkung einiger Theerproducte*, Münch. med. Wochenschr. N. 20, 1890.

fenico. Dirò inoltre che sciolto nell'acqua comune dà luogo a precipitati e perde notevolmente del suo potere disinfettante: le soluzioni nell'acqua distillata si mantengono invece lungamente trasparenti e inalterate. Si usa in soluzione di 1 a 3 fino a 10 per cento. Il lisolo, in causa specialmente delle sue proprietà, alcalina dissolvente, ha ricevuto un'importante applicazione nella disinfezione degli sputi tubercolari, nei quali penetra più facilmente degli altri disinfettanti.

Il *sozoiodolo*, che è un'altra sostanza della serie aromatica a cui si è voluto attribuire una notevole azione disinfettante, si dimostra invece realmente pochissimo attivo.

Fra i disinfettanti adoperati nella pratica merita menzione invece lo *iodoformio*, il quale viene usato con vantaggio in chirurgia per la medicazione delle ferite e delle piaghe. Lo studio del potere disinfettante di questa sostanza ha dato luogo a molte controversie, giacchè, mentre da un lato l'esperienza pratica dimostrava indubbiamente un'azione benefica dello iodoformio nel processo della suppurazione, cogli esperimenti di laboratorio invece veniva dimostrato che esso, lungi dall'uccidere i micrococchi piogeni nelle colture, non serve neppure ad impedirne lo sviluppo.

Quest'apparente contraddizione è stata tolta dagli studî recenti fatti sul modo di agire di tale sostanza: studî i quali hanno dimostrato da un lato che lo iodoformio, se non impedisce lo sviluppo dei batterî piogeni, può però impedire la formazione delle sostanze venefiche, irritanti, che essi producono normalmente, e dall'altro che lo iodoformio agisce anche da vero disinfettante, allorquando per opera dell'azione riducente dei batterî, o dei liquidi organici, si scompone e sviluppa iodo (1). Esso è perciò più attivo sui batterî anaerobî che su quelli aerobî.

Dobbiamo menzionare ancora una serie di sostanze alcaline le quali posseggono un alto valore disinfettante; e queste sono principalmente l'idrato di calcio, i carbonati di soda o di potassa e i saponi alcalini.

L'idrato di calcio si adopera sospeso nell'acqua (*latte di calce*), per lo più in proporzione del 20 per cento in volume, o dell'11 per cento in peso. Serve bene specialmente per la disinfezione delle materie fecali dei tifosi e dei colerosi, e per quella delle latrine. Quanto alla quantità di latte di calce da aggiungersi per ottenere una sterilizzazione sicura nei casi sopradetti, vale il dato pratico trovato da Pfuhl (2), e confermato esatto anche da Behring, che, cioè, si è certi di aver raggiunto l'effetto desiderato, allorquando le materie fecali, accuratamente mescolate colla calce, mostrano sulla carta rossa di tornasole una reazione *distintamente alcalina*.

L'uso dell'imbiancatura col latte di calce è caldeggiato da alcuni anche per la disinfezione delle pareti delle abitazioni, perchè di poco costo, e perchè il latte di calce fu realmente dimostrato attivo contro molti microrganismi patogeni (stafilococco aureo, bacillo del carbonchio senza spore, bacillo del tifo, del colèra e del moccio). L'essere però questa sostanza, secondo le esperienze di Jäger (3), da me ripetute con eguale risultato, poco attiva contro il bacillo della tubercolosi, fa sì che un tale disinfettante non possa avere un'applicazione generale, come ha invece il sublimato, per la disinfezione degli ambienti.

(1) Behring, *Ueber die Bestimmung des antiseptischen Werthes chemischer Präparate mit Berücksichtigung einiger Quecksilbersalze*, Deutsche med. Woch. 1889, N. 41-43.

(2) Pfuhl, *Ueber die Desinfection der Typhus und Cholera-ausleerungen mit Kalk*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 6, 1889.

(3) Jäger, *Untersuchungen über die Wirksamkeit verschiedener chemischer Desinfectionsmittel bei kurz dauernder Einwirkung auf Infectionsstoffe*, Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamte, Vol. V, 1889, pag. 247.

Anche i *carbonati alcalini* di sodio e di potassio ed i *saponi alcalini* hanno un potere disinfettante notevole. È importante il fatto che la loro attività è in proporzione del grado di alcalescenza, ed aumenta inoltre notevolmente coll'alta temperatura, quale si usa appunto nel lavare la biancheria colla liscivia ordinaria.

La soluzione calda di soda 1 % si adopera con vantaggio anche per la sterilizzazione dei ferri chirurgici.

I *disinfettanti gazosi*, anidride solforosa, vapori di bromo, di cloro e di iodio, nei quali per lo addietro si riponeva tanta fiducia, oggidì non si adoperano in pratica che punto o poco; alcuni perchè, come l'anidride solforosa, sono stati dimostrati poco attivi, ed altri perchè incomodi adoperarsi (cloro), e dannosi per le persone e per gli oggetti coi quali vengono a contatto. Non aggiungiamo altro su queste sostanze, poichè, anche astrazione fatta dal loro incerto potere disinfettante, sono tali gli inconvenienti inerenti al loro uso (prezzo elevato, velenosità, uso incomodo, danneggiamento degli oggetti, ecc), che oggidì che si conoscono altre sostanze, le quali senza avere gli inconvenienti di quelle, esercitano un'azione più sicura, non vale quasi la spesa di parlarne.

Il *cloruro di calce* commerciale è pure un disinfettante efficace e può usarsi utilmente per la disinfezione delle materie fecali e delle latrine. In causa però del suo contenuto di ipoclorito offre nell'uso gli stessi inconvenienti del cloro, mentre può, con eguale vantaggio, essere sostituito in quei casi dal latte di calce.

Dobbiamo menzionare finalmente gli *olii essenziali*, alcuni dei quali si distinguono non solo per un notevole potere disinfettante, ma anche, e specialmente, pel potere loro antisettico, il quale si dimostra superiore a quello dei migliori disinfettanti fin qui enumerati. Lo studio dell' azione di tali sostanze fu fatto prima da Chamberland (1) sul bacillo del carbonchio senza spore, e poscia da Cadéac e Meunier (2) sul bacillo del tifo e della morva. Le essenze più attive sarebbero quelle di cannella di Ceylan, di origano, di garofano, di geranio, di senape e di aglio.

È da notare però che l'azione irritante, il costo e la velenosità di alcune di esse fanno poco sperare per un'applicazione pratica delle stesse in sostituzione di altri disinfettanti.

Fra le sostanze volatili menzioniamo ancora il *cloroformio*, il cui potere microbicida, studiato da Salkowsky (3) e da Kirchner (4), si è dimostrato prontamente efficace sui microrganismi non sporigeni (bacillo del tifo, del colèra e del carbonchio, stafilococco aureo) e inefficace invece sulle spore (tetano e carbonchio).

Il cloroformio, aggiunto al siero di sangue e all'acqua comune ($^1/_2$—1 %), è stato proposto per la sterilizzazione del primo, in luogo del calore a 58°, e per la sterilizzazione dell' altra in casi di epidemia di tifo e di colèra. Resta ancora a vedere se la pratica confermi o meno tali applicazioni pratiche del cloroformio come disinfettante. Ad ogni modo, come antisettico, può il cloroformio venire adoperato come mezzo di conservazione delle sostanze ricche d'albumina (carne, latte), riescendo efficacissimo nell'impedirne la fermentazione e la putrefazione.

Chiudiamo la lista dei disinfettanti chimici col menzionare le *sostanze coloranti di anilina*, le quali, specialmente dopo le ricerche di Stilling (5), sono state

(1) Chamberland, *Les essences au point de vue de leurs propriétés antiseptiques*, Annales Pasteur, 1887, pag. 153.

(2) Cadeac et Meunier, *Recherches expérimentales sur l'action antiseptique des essences*, Annales Pasteur, 1889, pag. 317.

(3) Salkowsky, *Ueber die antiseptische Wirkung des Chloroformwasser*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 16, 1888 e Virchow's Archiv, Vol. 115, 1889.

(4) Kirchner, *Untersuchungen über die Einwirkung des Chloroforms auf die Bacterien*, Zeitschrift f. Hygiene Vol. 8, 1890, p. 465.

(5) Stilling, *Anilinfarbstoffe als Antiseptica und ihre Anwendung für die Praxis*, Strassburg, 189^.

oggetto di molto studio, specialmente per l'applicazione pratica che se ne è voluto fare. Secondo Stilling, la più attiva di queste sostanze sarebbe la così detta *pioctanina* (metilvioletto 5*b*), mentre secondo Behring le più attive sarebbero l'azzurro di dalia, la cianina e il verde di malachite. Per quanto le esperienze fatte finora abbiano dato risultati poco concordi, si può dire tuttavia che tali sostanze non sono chiamate a sostituire nella pratica gli altri disinfettanti già noti, essendosi dimostrate, ad es., assai meno attive della creolina inglese.

Questo rapido sguardo, passato sulle proprietà morfologiche e fisiologiche dei microrganismi, era necessario perchè su queste appunto sono informati i metodi di ricerca, e perchè lo studioso deve prima avere in mente tutti i diversi problemi che avrà da risolvere allorquando si accinge a studiare l'eziologia di un morbo infettivo. Non basta infatti, per risolvere un quesito di tal genere, la rivelazione di una forma qualsiasi di microrganismo e la dimostrazione del potere patogeno della stessa; bisogna eziandio ricercare esattamente quali sono le condizioni di vita del parassita al di fuori dell'organismo animale, vale a dire quali sono le sostanze nutritive più adatte al suo sviluppo ed alla sua riproduzione col mezzo di spore, quali le circostanze di temperatura, umidità, ecc., più adatte al compimento di quelle funzioni e quali invece in cui la vita si spegne; quali alterazioni il microbio produce nei mezzi di nutrizione, quali sostanze produce, quale è il suo modo di comportarsi verso i gas e verso i varî agenti fisici e chimici; e così di seguito una serie di problemi, dalla cui soluzione soltanto l'igiene può trarre quelle norme che sono più adatte a difendere il nostro individuo da siffatti nemici, i quali sfuggono alla osservazione ordinaria, e sono appunto perciò i più pericolosi.

CAPITOLO II.

Apparecchi e strumenti per le ricerche batteriologiche.

1. Microscopio.

Il primo e il più importante di tutti gli strumenti per questo genere di ricerche è indubbiamente il microscopio. La costruzione di questo e il modo di usarne sono oramai così diffusi, che può sembrare a prima giunta superfluo il parlarne qui in modo speciale: e tuttavia ciò è indispensabile, sia perchè fanno parte dell'osservazione microscopica dei microrganismi alcune particolarità, la cui applicazione segna uno dei più grandi progressi nella tecnica di questi studî, sia specialmente perchè il microscopio, corredato in modo da servire per le ricerche istologiche ordinarie, non serve sempre ugualmente per quelle batteriologiche, essendo per queste necessario un certo corredo speciale.

Di questo corredo due sono gli elementi principali: gli obiettivi ad immersione omogenea, e l'apparecchio d'illuminazione di Abbe.

a) Obbiettivi ad immersione omogenea.

Il principio dell'immersione si applica soltanto agli obbiettivi forti e consiste nell'interporre fra la lente inferiore dell'obbiettivo e il vetrino coproggetti uno straterello di liquido, che serva a diminuire o ad eliminare del tutto la dispersione dei raggi luminosi, prodotta dalla riflessione e dal deviamento che essi subiscono passando da un mezzo ad un altro di diverso potere rifrangente, e nel caso concreto dal vetrino nell'aria e da questa nella lente inferiore dell'obbiettivo.

Il liquido di immersione, che primo fu usato per opera di Amici, è l'acqua, la quale, essendo più rifrangente dell'aria, diminuisce di molto l'inconveniente sopra accennato: gli obbiettivi costrutti secondo il principio di Amici sono detti appunto *obbiettivi ad immersione ad acqua*. Stephenson perfezionò questo sistema, sostituendo all'acqua un liquido avente un indice di rifrazione approssimativa-

Veneziano Amici —

Lo stesso Amici cercò anche di perfezionare —

mente eguale a quello del vetro, e costituente così un sistema di mezzi (vetrino coproggetti, liquido d'immersione e lenti dell'obbiettivo) otticamente omogenei, che è quanto dire di eguale potere rifrangente. Abbe e Zeiss hanno applicato con molto successo un tale sistema alla costruzione di obbiettivi, che sono detti perciò *ad immersione omogenea*, e pei quali si adopera di solito l'olio di legno di cedro avente un indice di refrazione di 1,515.

Tali obbiettivi, pel fatto dell'« omogeneità » del liquido d'immersione, non hanno bisogno della *vite di correzione*, destinata in quelli ad acqua a correggere i difetti prodotti dallo spessore variabile del vetrino coproggetti, ed hanno anche per ciò su questi ultimi un notevole vantaggio.

Gli stessi Abbe e Zeiss hanno ancora perfezionato la costruzione dei loro obbiettivi colla fabbricazione dei così detti *apocromatici*, nei quali sono quasi completamente eliminati i due difetti principali inerenti agli altri obbiettivi, che sono l'*aberrazione sferica* e quella *cromatica*.

La prima si deve a ciò che i raggi luminosi, i quali attraversano una lente nella parte centrale, non convergono nello stesso punto di quelli che l'attraversano nella parte sua periferica, cosicchè l'immagine che se ne ottiene, invece di essere netta, è sfumata. L'aberrazione cromatica poi dipende da ciò, che i diversi raggi colorati della luce bianca subiscono attraverso le lenti una deviazione diversa, e le immagini hanno quindi contorni colorati. Tali difetti si aggravano sempre di più, se si aumenta l'ingrandimento con oculari forti.

Da ciò si comprende facilmente quali e quanti vantaggi realizzano gli apocromatici nell'osservazione microscopica, essendo sprovvisti di quei difetti. Anzitutto l'immagine da essi fornita è chiara e netta dappertutto, tanto nel centro come ai margini del campo microscopico, non ha contorni colorati e rappresenta perciò fedelmente il colore naturale degli oggetti che si esaminano. Oltre a ciò, gli apocromatici permettono l'uso di oculari forti, e danno così una serie estesa di ingrandimenti, senza che l'immagine microscopica perda della nettezza e chiarezza sua (1).

Negli obbiettivi apocromatici si trovano indicati i due elementi principali che servono a contraddistinguere la potenza ottica del sistema di lenti. Trovansi infatti in essi segnati due numeri: uno che indica l'*apertura numerica* del sistema di lenti, colla cui grandezza sta specialmente in rapporto il potere di risoluzione dell'obbiettivo, ossia la facoltà di fare apparire i dettagli più minuti della costituzione degli elementi, ed un altro numero indicante la *distanza focale* equivalente dell'obbiettivo stesso, che è un numero immaginario, equivalente alla distanza focale di una lente semplice che fosse capace di produrre lo stesso ingrandimento. La distanza focale equivalente negli apocromatici viene espressa in millimetri (2—2,5—3) e negli altri obbiettivi ad immersione in frazione di pollice ($^1/_{12}$—$^1/_{15}$).

(1) I vantaggi ottici degli apocromatici sono benissimo spiegati a pag. 6 del « *Manuale di Microscopia clinica* » di Bizzozero, 3.ª Ediz. Milano, 1888.

Alcuni piccoli difetti ottici, che rimangono ancora negli apocromatici, vengono corretti mediante oculari appositamente costrutti da Zeiss e che sono detti perciò *oculari compensatori*. Questi vengono indicati con cifre (4, 6, 8, 12) corrispondenti al numero di volte di che essi ingrandiscono l'immagine data dall'obbiettivo.

Per i cospicui vantaggi sovraesposti, non si può mai abbastanza raccomandare l'uso degli obbiettivi ad immersione omogenea, e specialmente degli apocromatici, per le ricerche batteriologiche. Per questi ultimi il prezzo elevato riesce forse d'ostacolo alla loro diffusione; ma a tale inconveniente hanno pure cercato di rimediare alcuni costruttori (Reichert e Koristka), costruendo un'altra specie di obbiettivi, *semiapocromatici*, i quali per proprietà ottiche stanno poco indietro ai veri apocromatici, ed hanno all'incirca lo stesso prezzo degli obbiettivi ad immersione omogenea ordinarî. Parlando della scelta del microscopio, saranno esposte le altre indicazioni relative a tali obbiettivi.

Nell'uso degli obbiettivi ad immersione omogenea bisogna avere l'avvertenza di mantenere invariata quella lunghezza del tubo del microscopio, per la quale sono adattati, e che pei nostri obbiettivi continentali è di 160 mm., misurati dal punto di unione dell'obbiettivo col tubo stesso.

Per adoperare tali obbiettivi, si pone una piccola goccia dell'olio di cedro sulla lente obbiettiva o sul vetrino coproggetti, oppure su ambedue, col che si evita l'inconveniente che si verifica talora, specialmente allorquando si mette una sola goccia sul coproggetti, del rimanere una bollicina d'aria aderente alla superficie inferiore della lente obbiettiva, essendo questa situata più profondamente del cercine metallico che la circonda. Finita l'osservazione, si toglie dapprima l'olio dall'obbiettivo con un pannilino fino di tela, asciutto, e poscia si sfrega leggermente la lente collo stesso panno bagnato con benzina pura. È bene tenere chiuso e riparato il pannilino che serve a questo uso, per evitare che vi cadano granelli di sabbia, i quali potrebbero scalfire la lente.

b) Apparecchio illuminatore di Abbe.

L'altra parte del microscopio, che ha pure un'importanza speciale per le osservazioni batteriologiche, è quella che riguarda la illuminazione del preparato. Questa si compie per mezzo dello specchio, che riceve i raggi della sorgente luminosa, e di un sistema condensatore di lenti, il migliore dei quali è quello costruito da Abbe, destinato a ricevere i raggi riflessi dallo specchio e a concentrarli nel punto dell'oggetto che si deve osservare. In tal guisa l'oggetto da osservarsi viene illuminato, non più da un fascio di raggi quasi paralleli, come succede per opera del solo specchio concavo, ma sibbene da un intiero cono luminoso, di grande angolo d'apertura,

il quale inonda di luce il preparato posto in corrispondenza dell'apice del cono stesso.

Questo fatto per l'osservazione delle preparazioni batteriologiche, le quali per la massima parte sono tinte coi colori d'anilina, ha un grandissimo vantaggio, specialmente se si tratta di sezioni di tessuto contenente batterì. Queste infatti, illuminate soltanto collo specchio, ci mostrano evidente la così detta *immagine di struttura* (Koch), ossia tutti i dettagli di struttura del preparato (limiti degli elementi cellulari, sostanza interstiziale, vasi sanguigni, ecc.), i quali spiccano perchè il potere di rifrazione delle diverse parti, del tessuto è diverso da quello del mezzo che le circonda, che d'ordinario è il balsamo del Canadà. Quest'immagine di struttura, costituita da linee e da ombre, fa sì che, se i batterì contenuti nel tessuto sono piccoli e sottili, oppure sono isolati, rimangono coperti e l'occhio dell'osservatore non arriva a scoprirne la presenza, oppure rimane incerto sulle loro particolarità: che se poi la sezione è un po' spessa, non appaiono neanche i microfiti più grossi. Adoperando invece il condensatore di Abbe, il quale concentra nel campo visivo una grande quantità di luce, le linee e le ombre delle parti incolore scompaiono e rimangono visibili soltanto quelle parti, le quali, essendo colorate, assorbono la luce e che in generale sono i nuclei cellulari e i microrganismi, oppure questi ultimi soltanto. L'uso del condensatore di Abbe e l'isolamento dell'immagine colorata che se ne ottiene sono pure un merito degli studì di Koch.

Ma non è perciò che il condensatore di Abbe serva solamente per l'osservazione dell'*immagine colorata*, giacchè questa si ha soltanto allorquando si adopera l'apparecchio di Abbe *senza alcun diaframma:* chè se invece si interpone fra quello e lo specchio un diaframma stretto, il quale non lascia passare che un fascio di raggi centrali, si hanno di nuovo all'incirca le stesse condizioni d'illuminazione che col semplice specchio, e quindi ricompaiono anche i contorni delle parti non colorate del preparato, ossia l'immagine di struttura.

Chè anzi l'uso dei diaframmi di diversa larghezza è assai importante a conoscersi per le osservazioni batteriologiche, giacchè in queste non di rado interessa osservare anche i dettagli di struttura del preparato. Così allorquando si osservano preparazioni non colorate, quali colonie di batterì nella gelatina o nell'agar, oppure batterì contenuti nelle goccie pendenti, si userà sempre un diaframma piuttosto stretto: quando invece si debbono osservare preparati colorati, si useranno diaframmi larghi, oppure addirittura il condensatore di Abbe senza alcun diaframma. Questo si

pratica specialmente per le sezioni dei tessuti *in principio dell' osservazione*, per acquistare anzitutto un' idea della presenza dei microrganismi nel tessuto, del loro aspetto e della loro disposizione.

Ma anche in tali casi può interessare di conoscere l'immagine di struttura, per giudicare dei rapporti che hanno assunto i microrganismi colle diverse parti del tessuto (per vedere se sono contenuti entro le cellule, o nei vasi sanguigni, linfatici, ecc.), ed allora si adopera un adatto diaframma, il quale permetta l'osservazione dei dettagli di struttura e quella dei batterî.

Oggidì si può coi diaframmi così detti *ad iride*, senza interrompere l'osservazione, cambiare ad ogni momento l' ampiezza del diaframma e l'illuminazione del preparato, e fare apparire così più o meno manifesta l' immagine delle diverse parti del preparato, che interessa osservare più distintamente.

Per l'uso conveniente dell'apparecchio di Abbe, oltre all'ampiezza dei diaframmi, bisogna tener conto di un' altra circostanza importante. Non bisogna dimenticare che, per ottenere un' azione massima da quell'apparecchio, è necessario che i raggi provenienti dalla sorgente luminosa si riuniscano esattamente nel piano dell'oggetto da osservare; e siccome il punto focale di quello, pei raggi paralleli, è situato a 2 mm. circa di distanza dalla sua lente superiore, così i raggi luminosi debbono essere in esso proiettati dallo *specchio piano*, perchè appunto sieno paralleli; giacchè se si usa lo specchio concavo e si fanno penetrare nell'apparecchio raggi convergenti, questi andranno a riunirsi in un punto così vicino alla lente sua superiore, che non sarà più possibile farlo cadere nello stesso piano dell'oggetto da osservare.

Deve poi l'apparecchio essere spostabile in alto od in basso mediante una vite, per ottenere che, allorquando varia la distanza della sorgente luminosa, i raggi convergano sempre nell' oggetto da osservare. Se infatti si adopera la luce solare riflessa dalle nubi, l'apparecchio di Abbe deve essere situato in alto, ossia vicino al preparato, perchè allora i raggi luminosi si riuniscono in un punto molto vicino alla lente superiore; se invece si osserva colla luce artificiale di una lampada, che è vicina al microscopio, è necessario abbassare il condensatore, perchè i raggi in tal caso convergono in un punto sito più lontano dalla lente sua superiore.

Per raggiungere lo scopo che si desidera, che, cioè, durante l'osservazione microscopica l'apice del cono luminoso dell'apparecchio condensatore coincida esattamente col piano dell' oggetto da osservare, si può fare in due maniere. O si comincia dall' osser-

vare con un obbiettivo debole e si sposta l'apparecchio d'illuminazione fino a che si vede chiaramente l'immagine dalla sorgente luminosa nel piano dell'oggetto, e si osserva poscia coll'obbiettivo più forte: oppure si mette a foco addirittura l'obbiettivo ad immersione e poscia si modifica la posizione dello specchio e del condensatore, fino ad ottenere il *massimo di illuminazione*.

A complemento di quanto si è detto a riguardo dell'uso del microscopio nelle ricerche batteriologiche, espongo ora il corredo di che deve andare munito un microscopio, perchè corrisponda alle esigenze principali di un tal genere di ricerche.

Riguardo allo stativo, esso dev'essere munito dell'apparecchio di Abbe, di un revolver per tre obbiettivi e del diaframma ad iride e deve anche preferibilmente avere il movimento del tubo ad asta dentata e pignone (cremaillére). Quanto alla parte ottica, sono necessarî almeno due obbiettivi a secco, 3 e 7, due oculari, 2 e 4, di cui uno munito del micrometro oculare, e finalmente un obbiettivo ad immersione omogenea. Di tali obbiettivi consiglio dare la preferenza, sia per le proprietà ottiche che pel costo relativamente basso, ai *semiapocromatici*, costruiti finora da Reichert e da Koristka.

Quanto ai fabbricanti, molti ve ne sono i quali forniscono microscopî di ottima qualità. Cito primo fra questi nel continente Zeiss (1) di jena, il quale però, se fornisce buoni strumenti, tiene anche i prezzi piu elevati degli altri fabbricanti. Per l'uso comune raccomando specialmente, secondo la mia esperienza, seguenti modelli di Reichert di Vienna (2), e di Koristka di Milano (3).

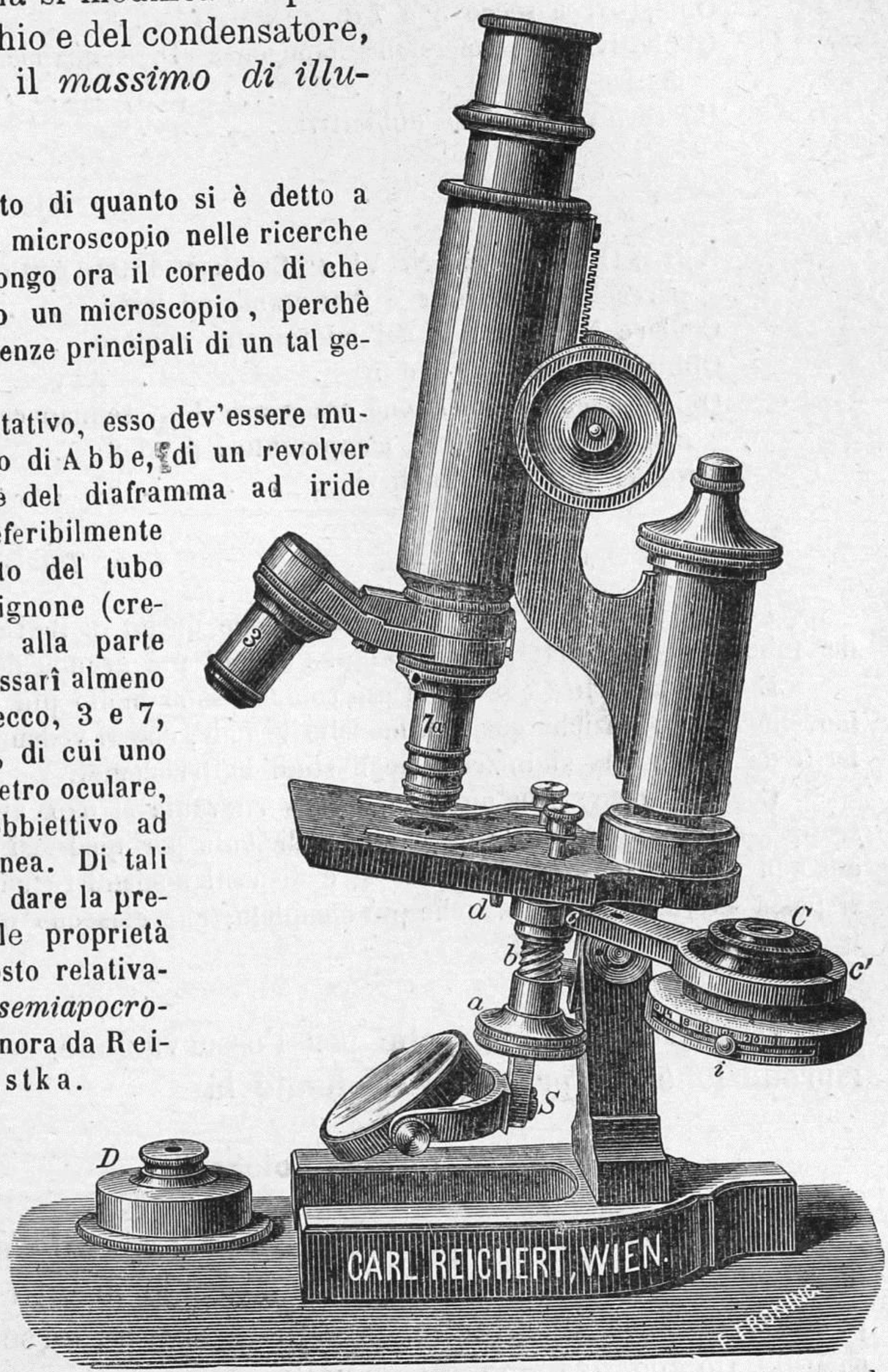


Fig. 1. — Microscopio Reichert, modello medio, col movimento ad asta dentata e pignone

(1) Rappresentante di Zeiss in Italia è il sig. Eisenträger, Via Gesù 8, Milano
(2) C. Reichert, VIII Bennogasse 46, Vienna.
(3) F. Koristka, Via S. Vittore, 47, Milano.

Reichert, stativo modello III (N. 7 del Catalogo 1890). Questo modello medio (fig. 1), munito com'è del movimento a pignone e ad asta dentata, è straordinariamente comodo e costa, munito dell'apparecchio di Abbe e del diaframma ad iride . . . . . L. 143
Oculari 2 e 4 . . . . . » 16
Un micrometro oculare. . . . . » 6
Obbiettivi a secco 3 e 7 *a* . . . . . » 66
Obbiettivo ad immersione omogenea 18, semiapocromatico (1) . . . . . » 200
Un revolver per tre obbiettivi . . . . . » 31

Totale L. 462

Koristka. Stativo N. VI *a* (Catalogo 1892) coll'apparecchio di Abbe e diaframma ad iride. . . . L. 170
Oculare N. 3 munito del micrometro oculare . . . » 18
Obbiettivi a secco 3 e 7* . . . . . » 65
Obbiettivo ad immersione omogenea $^1/_{15}$, semiapocromatico, cogli oculari compensatori 4 ed 8. . . . » 200
Revolver per tre obbiettivi . . . . . » 25

Totale L. 478

Lo stativo di Koristka ha pure, come quello di Reichert, il movimento del tubo ad asta dentata, ed è soltanto un po' più grande del primo.

È bene avvertire che per l'uso comune sono molto più comodi gli stativi di modello medio, anzichè quelli di modello grande, che si vedono invece sovente preferiti da coloro che si iniziano negli studî batteriologici.

Come si vede, con una spesa poco rilevante si può avere un buon microscopio, corredato in modo da essere sufficiente per qualsiasi genere di ricerche: ciò non esclude però che, quando si è disposti a spendere una somma maggiore, si possa avere un corredo anche più completo, che ciascuno può scegliere secondo le proprie vedute.

Il microscopio, oltrechè per l'osservazione, serve anche per la riproduzione dei preparati mediante la

c) **Microfotografia.**

Questo mezzo di riprodurre i preparati, caldamente raccomandato da Koch, per quanto sia il più fedele di tutti per la esatta riproduzione dell'immagine microscopica, non ha forse in pratica quella grande importanza che gli si volle attribuire in principio, ammettendo che, per istituire confronti con fondamento di verità, sia indispensabile l'applicazione di un tal mezzo e che molte divergenze nelle questioni batteriologiche sieno in gran parte dovute alla trascuranza dello stesso da parte degli osservatori.

(1) Chi vuole spendere meno può acquistare il semi-apocromatico 18 *b* dello stesso fabbricante, che costa L. 125 ed è soltanto di poco inferiore al 18.

I vantaggi che offre la fotografia, rispetto ai metodi ordinarî di riproduzione delle imagini osservate al microscopio, sono tuttavia abbastanza importanti. È noto infatti che sono moltissime le condizioni che fanno variare l'aspetto dell' imagine microscopica: un diaframma più largo o più stretto, un oculare più o meno forte, una maniera diversa di fare e di colorare il preparato, il trovarsi questo rinchiuso in liquidi di diverso potere rifrangente, e così via, sono altrettante circostanze che fanno variare sensibilmente l'imagine dello stesso preparato; e nel caso nostro, trattandosi di oggetti così minuti e delicati come i microrganismi, possono farceli apparire ora più grossi e ora più sottili, ed anche sotto un aspetto tanto differente, da farli ritenere diversi, oppure possono anche nasconderli affatto alla nostra osservazione.

In questi casi è assai difficile di potere rintracciare in quale delle circostanze anzidette si trova la causa dell'errore, di vedere, cioè, se si deve al microscopio, oppure al modo di fare il preparato, il diverso apparire di un medesimo oggetto.

Ad ovviare a tale inconveniente serve bene la microfotografia, perchè questa riproduce sempre l'imagine esattamente nella stessa posizione, ingrandimento ed illuminazione in cui fu presa; si può allora quel dato oggetto misurare, disegnare e confrontare con altri fotogrammi, per vedere così in quali condizioni diverse fu riprodotta l'imagine stessa negli altri casi.

Un altro vantaggio incontestabile consiste in ciò, che nella fotografia l'oggetto si riproduce da per sè e non è riprodotto dalla mano di chi osserva, il quale per lo più tende involontariamente ad abbellire ed a rendere l' imagine più dimostrativa per qualche veduta teorica che può avere in mente. La riproduzione fotografica invece è la più fedele di tutte, e permette ad un osservatore di potere controllare i risultati ottenuti da un altro in lontananza, come se avesse sott'occhio lo stesso preparato microscopico.

Questo è forse il vantaggio più rilevante per la scienza, perchè non v'ha dubbio che il sapere che i preparati possono essere veduti quali sono, e controllati da tutto il mondo scientifico, costringe il microscopista a sottoporre a prove e riprove l'esattezza delle sue osservazioni, prima di comunicarle al pubblico.

Per citare un esempio, riferito da Koch per dimostrare l'importanza della fotografia nello studio dei microparassiti, basti dire che Lewis (1) avea descritto una forma di spirocete nel sangue dei malati di tifo ricorrente nell' India, avente

(1) Lewis, *The microscopics organism found in the blood of man and animals*, Calcutta, 1879.

uno spessore più grande di quella corrispondente, osservata in Europa da Obermeier e da altri. Si erano ammesse così due varietà di spirocete, l'indiano e l'europeo, corrispondenti a due forme diverse della stessa malattia. Koch invece, confrontando le fotografie dei preparati microscopici dello spirocete indiano fatte da Lewis con quelle dei preparati proprî, ha potuto constatare che i primi erano stati riprodotti con diaframmi più stretti, i quali, come è noto, fanno risaltare assai i contorni degli elementi, e che si era data in tal guisa al microparassita l'apparenza di uno spessore maggiore di quello riprodotto da Koch. Difatti quest'ultimo, essendosi poscia procurato gli spiroceti indiani, li ha fotografati nelle stesse condizioni dei suoi, e li ha ottenuti riprodotti nella stessa forma e colla stessa grandezza di quelli europei.

Finalmente la fotografia è utile, anche perchè riproduce l'imagine microscopica meglio e con particolari più minuti di quelli a cui può essere sensibile la retina del nostro occhio. Difatti la lastra sensibile fotografica è una specie di occhio, il quale però non si restringe colla luce viva, non si stanca a distinguere le piccole differenze di luce, e non è turbato nell'osservazione dagli intorbidamenti del vitreo. E che sia più sensibile dell'occhio stesso lo dimostra il fatto, che talora oggetti finissimi, ad esempio le ciglia di alcuni microbi, le quali, finchè non si trovò il mezzo di colorarle, sfuggirono all'osservazione più accurata, si possono dimostrare invece anche nei preparati incolori, riproducendoli colla fotografia.

Di fronte a questi vantaggi incontestabili, la riproduzione microfotografica ha però l'inconveniente di essere difficile e lunga da praticarsi; non è quindi probabile che la sua applicazione addivenga generale, finchè almeno non si sia trovato il mezzo di semplificarla, tanto da metterla alla portata di tutti. Oltre a ciò, la fotografia non riproduce i microrganismi coll'aspetto col quale si osservano generalmente, ossia colorati coi diversi colori d'anilina.

La riproduzione fotografica dei microrganismi non si differenzia essenzialmente da quella degli altri preparati microscopici, per cui qui accenneremo soltanto alle norme principali relative al caso speciale.

In principio si aveva già una certa difficoltà nello allestire i preparati per la riproduzione fotografica, giacchè erano adatti soltanto quelli colorati coi colori bruni d'anilina (bruno di Bismarck e vesuvina); oggidì invece, coll'uso delle lastre isocromatiche ed ortocromatiche, si riproducono bene i preparati fatti con qualsiasi colore, e specialmente quelli tinti in rosso colla fucsina.

Per la microfotografia poi rendono eccellenti servigi gli obbiettivi apocromatici, giacchè anche i raggi chimici non subiscono in essi nè aberrazione sferica, nè differenza alcuna di rifrazione.

Il modo d'aggiustare il microscopio è quello stesso già indi-

cato, che serve a dare l'imagine più chiara, più netta e meglio illuminata dell'oggetto da riprodursi. Per maggiori particolari sulla tecnica microfotografica, rimandiamo il lettore ai manuali di Neuhauss (1), di Fränkel e Pfeiffer (2) e di Roster (3).

Aggiungo soltanto che si deve assolutamente evitare qualsiasi ritocco o modificazione, sia della negativa che del ritratto, anche se la riproduzione non riuscì perfetta. I preparati fotografati appaiono anzi sempre in parte confusi, poichè viene riprodotto esattamente un solo strato, o meglio una sola parte di esso: giacchè tutto il resto, che non trovasi perfettamente a foco, dà semplicemente un'imagine sfumata in grado diverso, a seconda della diversa distanza dalla parte riprodotta.

Microtomo.

Un altro strumento, che è pure molto usato nella tecnica batteriologica, è il *microtomo*. Stimo opportuno perciò il darne qui una descrizione particolare, perchè è mio intento di riunire in questo libro tutto quanto può occorrere allo studioso per simili ricerche, senza che questo senta il bisogno di ricorrere qua e là ad altri manuali, ed anche perchè vi sono nell'uso di questo strumento alcune speciali avvertenze per l'oggetto particolare di ricerca c e ci riguarda.

Quando si voglia studiare la disposizione che hanno i microrganismi nell'interno degli organi, i rapporti che contraggono coi singoli elementi dei tessuti e la diffusione loro negli stessi, è necessario di potere avere sott'occhio un' estensione di tessuto piuttosto grande ed uniforme, ed è necessario inoltre di ottenere serie successive e continue di sezioni, che permettano di seguire nello interno di un organo lo sviluppo e la diffusione degli stessi microbi. Orbene, per tutto questo è indispensabile il microtomo.

Si distinguono in generale due categorie di microtomi, a slitta ed a vite; tipo principale rappresentante di quelli a slitta è il microtomo di Thoma-Jung, e di quelli a vite è il microtomo di Schanze. Diamo qui la descrizione di questi soltanto, giacchè le altre numerose varietà di microtomi che esistono non sono in massima parte che modificazioni di questi due tipi principali.

(1) Neuhauss, *Lehrbuch der Mikrophotographie*, Braunschweig, 1890.

(2) Fränkel e Pfeiffer, *Das Verfahren der photographischen Darstellung von Bacterienpräparaten* (Einleitung aus dem mikrophotographischen Atlas der Bacterienkunde, Berlin, 1889).

(3) Roster, *Manuale di microfotografia*, Firenze, 1892.

Il microtomo di Thoma (1), noto anche col nome di microtomo di Jung (Fig. 2) che ne è il fabbricante, è un *microtomo a slitta*, fatto di ghisa massiccia, nella quale sono scavate due scanalature triangolari, parallele fra di loro e divise da un piano di metallo piuttosto grosso; in uno dei solchi scivola a dolce sfregamento un grosso pezzo di ferro (M) conico, su cui si fissa il coltello, mentre l'altro è destinato a ricevere il pezzo portoggetti (O). Ciascuna di queste due slitte poggia sul solco corrispondente per mezzo di cinque punti, ossia scorre su cinque superficie larghe da 2-3^{mm}, il che permette una grande solidità, e al tempo stesso un facilissimo movimento delle slitte. Bisogna sempre badare a che la slitta che porta il coltello scivoli, ogni volta che si fa una sezione, su tutta quanta la superficie di scorrimento e non su di una parte soltanto della stessa; e ciò per evitare che, dopo un certo tempo che si usa il microtomo, si abbiano disuguaglianze e salti nello scivolamento del coltello, per essersi consumata una parte della superficie di scorrimento più dell'altra. La lama del coltello è larga e pesante, ed il manico è ripiegato in modo, che quando questo si trova in posi-

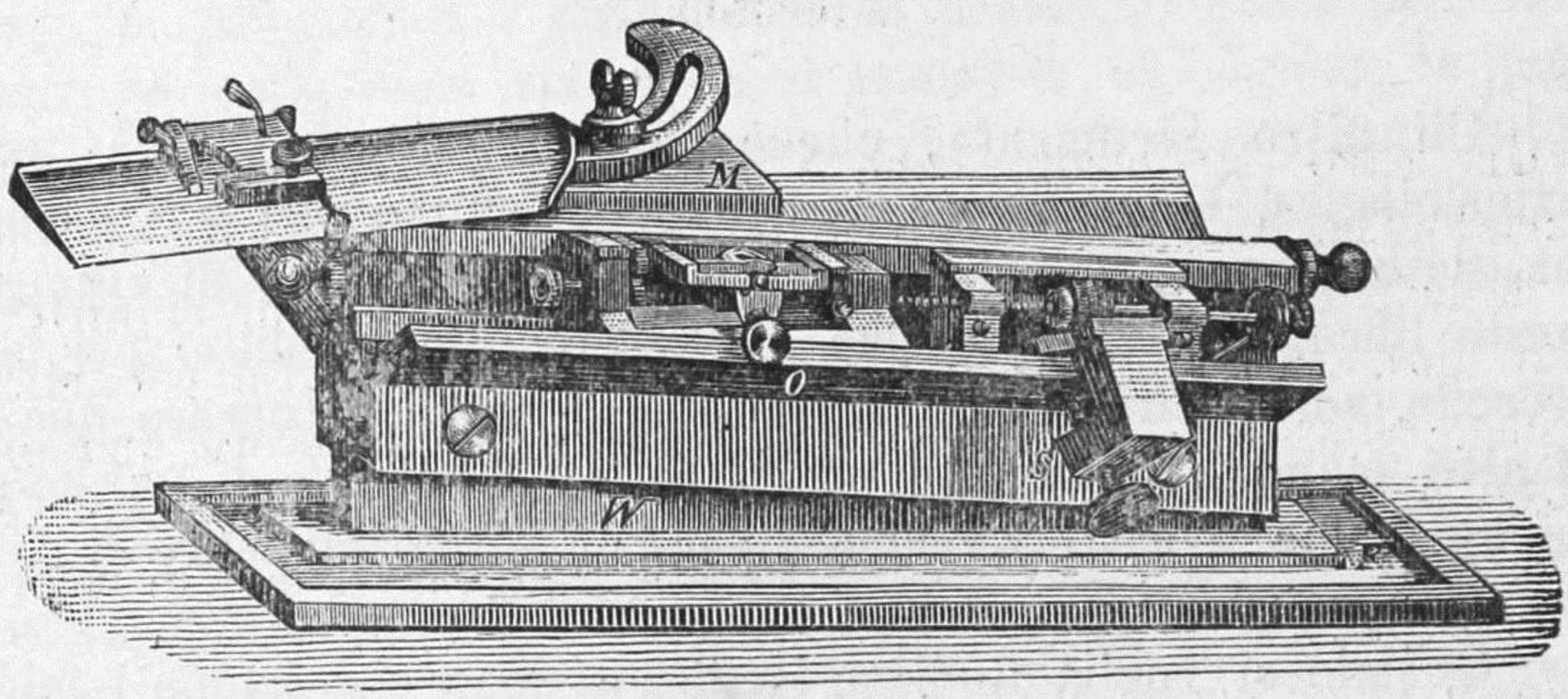


Fig. 2. — Microtomo di Thoma-Jung.

zione orizzontale, il tagliente della lama trovasi diretto alquanto all'ingiù. Il manico ha una larga fenditura destinata a ricevere la vite che serve a fissarlo. La scanalatura in cui scorre il pezzo portoggetti è dolcemente inclinata, e per effettuare lo scorrimento di questo, avvi un apparecchio a vite micrometrica portato da una terza slitta (S), la quale si può fissare col mezzo di una grossa vite a pressione in un punto qualunque del microtomo. La punta della vite micrometrica poggia contro una laminetta liscia di agata, fissata all'estremità posteriore della slitta portoggetti. Alla metà della lunghezza di questa vite si trova un disco metallico, nella cui periferia sono incise 25 divisioni lineari, ciascuna delle quali, girando, corrisponde ad uno spessore di sezione di 0,001^{mm}. Questa vite micrometrica è stata ora anche perfezionata, giacchè il disco porta in luogo delle divisioni lineari altrettanti denti, su cui scatta una penna metallica; e così invece di dover leggere sulla scala o spessore della sezione che si desidera, questo si viene a conoscere per mezzo del romore, il quale indica il numero di divisioni che ha percorso la vite. È questo un vantaggio, utile specialmente allorquando si tratta di sezionare in serie, nel qual lavoro l'occhio è già abbastanza occupato. Se poi non si desidera una tale disposizione, non si ha che cangiare la posizione di una leva e la penna non scatta più.

È importante badare a che ogni singola parte, ma specialmente le superficie

(1) Thoma, *Ueber ein Microtom*. Virchow's Arch. Bd. 84, p. 189-191; e Journ. R. Microsc. Soc. London, ser. II, vol. III, 1883, p. 298-307.

di scorrimento, sieno lubrificate col così detto *olio di ossa* e mantenute prive di polvere e di ruggine, se si vuole che lo scivolamento sia sempre uniforme e regolare.

Il microtomo costruito dal meccanico Schanze di Lipsia (Fig. 3) è una felice combinazione dei due sistemi, a vite ed a slitta; il coltello viene mosso colla slitta, e l'oggetto invece si innalza per mezzo di una vite verticale. È preferibile il modello fabbricato in ghisa nichelata a quello fatto d'ottone, giacchè nel primo lo sfregamento è molto minore. Il disco (S) porta una larga ruota, sui margini del [illegible] trova una divisione in gradi che permette di leggere facilmente di quanto il disco si gira; ciascuna divisione corrisponde a un innalzamento dell'og-

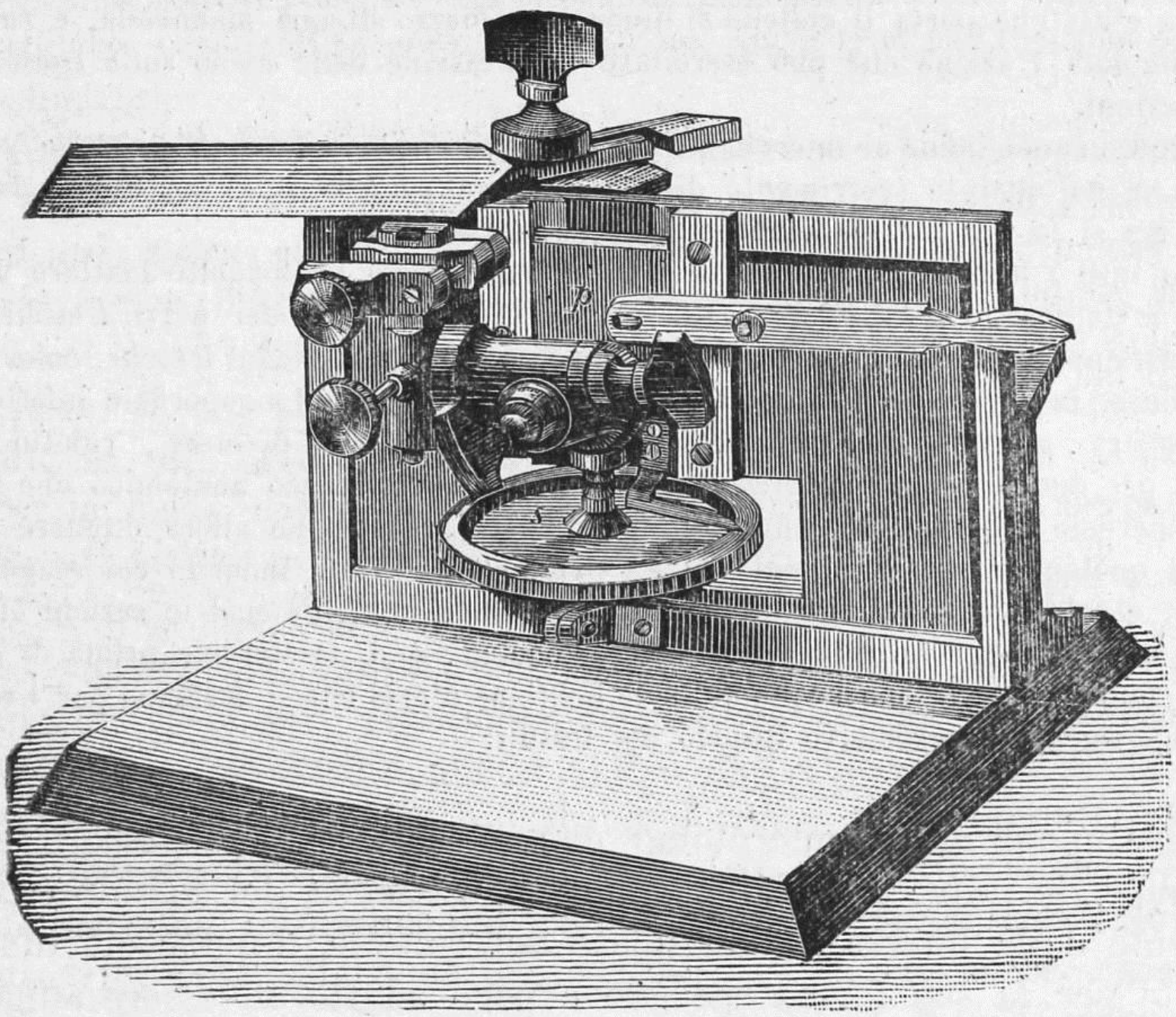


Fig. 3. — Microtomo di Schanze.

getto di $^1/_{100}$ mm. La testa della vite agisce anzitutto sulla lastra metallica P, la quale porta la morsa in cui si fissa l'oggetto da sezionare. Due assi metallici, disposti ad angolo retto e provvisti ciascuno di una vite a pressione, servono a piegare la morsa portoggetti in qualunque direzione, mentre un terzo braccio la fa girare attorno al proprio asse e permette di innalzarla perpendicolarmente. L'innalzamento dell'oggetto non si compie adunque per azione diretta della vite: la qual cosa, se nuoce un poco all'esattezza ed alla regolarità dell'elevazione, ha d'altronde il vantaggio che l'alcool con cui si bagna il coltello non isgocciola sulla vite e non ne disturba il movimento. La morsa è composta di due branche parallele, che si avvicinano per mezzo di un'altra vite. Per fare sgocciolare l'alcool sul coltello, senza aver bisogno di doverlo bagnare ogni volta con un pennello, e per avere libere le mani, si adatta con un sostegno sopra il coltello una bottiglia di vetro, munita di un rubinetto capillare che lascia cadere l'alcool a goccia a goccia.

Un altro apparecchio accessorio del microtomo, da raccomandarsi special-

mente per sezionare i pezzi inclusi in paraffina, è quello destinato ad impedire l'accartocciarsi delle sezioni (*Schnittstrecker*), il quale si adatta sulla lama del coltello, come si vede nel disegno del microtomo di Thoma, ed è di varia forma secondo i fabbricanti.

Fra le tante modificazioni proposte a questi microtomi, una delle migliori è quella introdotta da Spengel (1) nel microtomo di Thoma-Jung. Le variazioni principali fatte da Spengel nel suo microtomo, costrutto dal meccanico Becker di Gottinga, consistono in ciò che i piani dove scorrono le slitte, invece che di ferro, sono di vetro, e le slitte poggiano su di essi per mezzo di punte d'avorio, in guisa che lo scorrimento è facile ed uniforme ed i piani non si consumano; oltre a ciò la slitta che porta il coltello si muove per mezzo di una manovella, e resta così eliminata l'azione che può esercitare la pressione della mano sullo spessore delle sezioni.

Accenniamo infine ai microtomi così detti *automatici*, dei quali esistono varî modelli, e nei quali lo scorrimento di una o di ambedue le slitte non è fatto dalla mano, ma si fa per mezzo di un qualche meccanismo.

In tutti i microtomi si può nel luogo della morsa portoggetti adattare una piastra metallica, oppure una cassetta per la *congelazione* dei pezzi freschi; e con quest'apparecchio si è in grado di ottenere sezioni di organi freschi, colorate e rinchiuse, in un quarto d'ora appena dopo la necroscopia. La superficie inferiore della piastra, o cassetta che sia, viene colpita da un getto di etere, ridotto in polvere per mezzo di un polverizzatore ordinario, ed il pezzo anatomico che sta sulla superficie superiore si congela in pochi istanti. Si possono allora ottenere sezioni di qualunque spessore, come da un pezzo che sia stato indurito coi reagenti chimici, e solo è da avvertire di immergere lentamente nell'alcool le sezioni ottenute in tal modo, per impedire che si accartoccino, e di lasciarvele prima di colorarle, fino a che si sono svolte tutte le bollicine d'aria che si formano per l'atto del congelamento e successivo disgelo dei tessuti.

Qualunque sia il microtomo che si adopera, lo spessore dei tagli dipende, oltre che dal grado di consistenza del tessuto, specialmente dalla finezza del tagliente del coltello, il quale sfortunatamente per la sua forma speciale è poco adatto ad essere affilato sulla pietra da rasoj. Bisogna ben guardarsi dal dare ad affilare agli arruotini ordinarî uno di questi coltelli, e bisogna invece esercitarsi ad affilarlo da noi stessi. A tal uopo si prende una pietra bastantemente lunga e larga, e la si spalma di un miscuglio di glicerina e di alcool, le cui proporzioni dovrebbero variare secondo la qualità della pietra, ma che in generale possono essere di 2 parti di glicerina ed 1 di alcool. Si poggia a piatto sulla pietra la lama del coltello nella sua parte più vicina al manico, e quindi si fa strisciare *col tagliente rivolto all' innanzi, lentamente e senza premere*, ma soltanto per forza d'adesione, in modo che si giunga alla fine della pietra coll'estremità libera del coltello. Si volta

(1) Spengel. *August Becker's Schlittenmikrotom*; Zeitschr. f. wiss. Mikrokopie, 1885, pag. 453.

allora la lama sul dorso, e si torna indietro strisciando sulla pietra colle stesse avvertenze, per far ritorno nella posizione primitiva. Nel far ciò bisogna badare di non sollevare mai dalla pietra il dorso del coltello, e di non esercitare mai pressione di sorta, lasciando che il coltello stesso strisci per la semplice forza di adesione molecolare. Dopo 15-20 volte che si è ripetuta questa manovra, si prova delicatamente sulla pelle della palma della mano distesa se si è raggiunto il grado necessario di acutezza del tagliente, e si adatta poscia sulla slitta. Si può anche usare egualmente per affilare i coltelli la cote di cuoio, su cui si trova distesa la pasta collo smeriglio.

Anche nel fissare il coltello sul microtomo bisogna avere alcune avvertenze. Il coltello dev' essere situato in modo, che *cominci ad agire sul pezzo da sezionare col principio del tagliente* e non urti in quello colla parte smussa, nè cominci a tagliare col mezzo della lama. La seconda avvertenza si è che, quando si è posto in sito l'oggetto, si deve ad ogni volta provare quale è l'angolo più favorevole che deve fare con quello il coltello, perchè la lama, corrispondentemente alla larghezza del preparato, *venga utilizzata in tutta la sua lunghezza.*

Per quel che riguarda la fissazione del pezzo anatomico sulla morsa portoggetti, questa anzitutto può essere di varia forma e grandezza, ed è anzi necessario averne più di una di ricambio. In generale sono preferibili quelle morse che sono costituite da due branche parallele, avvicinabili fra di loro, e che si possono muovere e girare in qualunque direzione, in modo da poter situare l'oggetto nella posizione più conveniente, tanto a riguardo del punto della lama che deve incominciare il taglio, come riguardo al piano di sezione del coltello stesso. In ogni caso il preparato dev' essere situato ben fisso sulla morsa, e per far ciò lo si attacca colla soluzione di gomma, o colla così detta còlla liquida sopra un pezzo di sughero tagliato ben liscio; oppure si mette colla gomma fra due pezzi di midollo di sambuco, o di fegato amiloideo, o di cervello indurito nell'alcool, e quindi si immerge in questo liquido, il quale indurisce la gomma e fa sì che il preparato (che dev' essere non molto grande) aderisca tenacemente al materiale che serve a fissarlo. Condizione essenziale per avere buone sezioni è che il pezzo sia bene indurito. Si può anche senz' altro porlo direttamente fra due lamine di fegato nella morsa, e quivi fissarlo colla vite in modo che sporga da quella di 1-2^{mm}.

Allorquando la superficie dell'oggetto da sezionare è irregolare, e si vogliono ottenere sezioni anche di questa, la si rende eguale

coprendola di uno strato sottile di mucillaggine di gomma, vi si pone sopra una lamina di fegato indurito e si immerge il tutto nell' alcool, per fare aderire il fegato alla superficie del preparato. Bisogna badare a che la gomma nell'alcool non divenga troppo dura e danneggi quindi il tagliente del coltello. Bizzozero ha trovato che per ottenere un indurimento giusto di quella sostanza è adatto un alcool che abbia un peso specifico di 0,875.

Si può anche usare con vantaggio il miscuglio di glicerina e gelatina proposto da Klebs. Si fanno rigonfiare nell'acqua 10 gr. di gelatina purissima, si decanta l' eccesso di acqua, si fa sciogliere la còlla a moderato calore e vi si aggiungono 10 gr. di glicerina con qualche goccia di soluzione di acido fenico per conservarla. Questa miscela alla temperatura ordi ria è solida; volendosene servire per lo scopo anzidetto, si liquefa, se ne versa un poco sulla superficie del preparato fino a coprirne le disuguaglianze, si fa raffreddare e si tiene nell'alcool, fino a che ha acquistato consistenza sufficiente per farne sezioni.

Finalmente vi sono alcuni oggetti, i quali, o contengono cavità molto grosse (embrioni), oppure hanno un contenuto d'acqua troppo forte, o sono troppo grandi per acquistare coi mezzi ordinarî un indurimento sufficiente per essere tagliati in lamelle sottili: ed allora si ricorre ad un altro spediente, alla così detta *inclusione* in mezzo a sostanze, le quali allo stato liquido penetrano non soltanto nei grossi spazî vuoti, ma anche nell'interno del tessuto, e solidificandosi poscia per opera del semplice raffreddamento, o per l'azione dell'alcool, impartiscono al preparato un grado tale di omogeneità e di consistenza, che lo rende atto ad essere sezionato.

Le sostanze che si possono adoperare per l'inclusione dei preparati sono assai diverse; qui però dobbiamo limitarci ad accennare soltanto a quelle che offrono maggiori vantaggi, anche avuto riguardo allo scopo nostro speciale della ricerca dei microrganismi nei tessuti. Queste sostanze sono la *paraffina* e la *celloidina*.

a) Inclusione in paraffina.

I pezzi, precedentemente induriti nell'alcool assoluto e completamente disidratati, si immergono anzitutto nel cloroformio, oppure negli olii essenziali diluiti coll'alcool in vario grado. Siccome pare, per quanto non si sappia ancora in quale misura, che il cloroformio tolga a certi microbi la proprietà di combinarsi coi colori d'anilina, si può usare pel nostro intento l'olio di trementina, o

l'olio di bergamotto, o il petrolio. Francotte (1) consiglia di dire questi olii nelle proporzioni seguenti:

1 vol.	olio di	trementina	e 2 vol.	alcool
1	»	»	1 »	»
2	»	»	1 »	»

Si tiene immerso il preparato in ciascuno di questi tre miscugli successivamente per qualche ora, e si pone poscia in una soluzione satura di paraffina nell'olio di trementina, riscaldata nel bagno maria a 50° C. Dopo qualche tempo si immerge nella paraffina pura, liquefatta a bagno maria, la quale va a sostituire l'olio etereo nell'interno dei tessuti in un tempo variabile da 1 a 12 ore, secondo la grandezza e secondo la qualità dell'oggetto. Quest'ultima operazione deve essere compiuta in uno speciale apparecchio, o cassetta riscaldata a temperatura costante, che deve essere regolata fra 45-50° C. Siccome vi sono varie specie di paraffina, che hanno un punto di fusione diverso, così se ne dovrà scegliere una che si mantenga liquida alla temperatura anzidetta, nello intento di evitare che una temperatura più elevata alteri la struttura del tessuto. In generale si deve scegliere una paraffina che sia semitrasparente, che si rompa facilmente, ed il cui punto di fusione sia fra 45-50° C.

Di questi apparecchi per l'inclusione in paraffina ve ne sono di varî modelli; come uno dei più usati si può designare quello conosciuto col nome di stufa per paraffina di Mayer, a bagno maria.

Una volta compiuta l'operazione, si prende un pezzo di sughero, si circonda di carta in modo che questa formi al disopra del sughero stesso una specie di cassetta circolare, si fissa la carta al sughero con una punta metallica, e vi si versa la paraffina liquida, adattandovi l'oggetto da sezionare nel modo più conveniente; si copre questo con un nuovo strato di paraffina e si fa raffreddare immergendolo nell'acqua. Se il pezzo è grosso, si fa la stessa operazione entro una scatoletta di carta quadrangolare.

Molto più spiccio, e altrettanto sicuro, è il metodo seguente di Giesbrecht, modificato da Vogt. I pezzi induriti nell'alcool assoluto si immergono direttamente nel cloroformio, ove in principio galleggiano; vi si versa sopra a poco a poco una certa quantità di alcool, fino a che ricopre il preparato, e si lascia questo fra i due liquidi, finchè sia compiuta la miscela degli stessi e il pezzo sia caduto al fondo. Questo accade in un tempo che varia secondo la

(1) Francotte, *Microtomes et méthodes d'inclusion*, Bull. Soc. belge de Microsc., t. X. 1883-84, N. 3, p. 55.

grandezza e secondo la natura del tessuto, ma che in generale non sorpassa le 12 ore. A questo punto il preparato è già completamente imbevuto di cloroformio, ed è pronto perciò per essere messo in paraffina.

Giesbrecht consiglia di immergerlo prima in una soluzione concentrata di paraffina nel cloroformio, riscaldata a bagno maria. Si può però fare a meno di questa parte dell'operazione, e portare direttamente il pezzo dal cloroformio nella paraffina liquefatta alla temperatura di 45-50° C. In questa si lascia per mezz'ora o poco più, e quindi si estrae e si fissa senz'altro sul piatto del microtomo (quello che serve per la congelazione) con una goccia di paraffina.

Le sezioni dei pezzi inclusi in paraffina si fanno senza bagnare il coltello coll'alcool.

La parte più tediosa forse di questo processo è il trattamento successivo che devono subire le sezioni, prima di essere colorate. Appena queste si sono tagliate, impedendone l'accartocciamento, come si è detto, si portano nell'olio di trementina, in cui divengono presto trasparenti, giacchè la trementina scioglie in pochi minuti la paraffina di cui sono impregnate. Da qui si passano nell'alcool assoluto che si sostituisce alla trementina; dall'alcool assoluto si portano nell'alcool ordinario e da questo nell'acqua, donde, dopo averle ben lavate agitando, si portano di nuovo nell'alcool assoluto prima di colorarle coi metodi ordinarî. Non bisogna dimenticare quest'ultimo momento dell'operazione, che è assai importante per la buona riuscita della colorazione.

L'inclusione in paraffina, è quella che permette di fare le sezioni più sottili ed in serie regolari di qualsivoglia organo e tessuto, anche se questo è formato da parti discontinue. Il processo è inoltre così semplice, che riesce dopo poche prove anche per mano dei poco esperti, cosicchè in breve tempo è addivenuto il più diffuso e il preferito da tutti. A lato di questi vantaggi però avvi anche l'inconveniente della temperatura elevata a cui si devono assoggettare gli oggetti per un certo tempo, il che rende talora duri e friabili i tessuti e fors' anco li altera, diminuendo in pari tempo l'affinità di certi micropassiti pei colori d'anilina.

b) Inclusione in celloidina.

È questo forse il metodo più confaciente pel nostro genere di ricerche, giacché non richiede una temperatura elevata ed è più semplice il trattamento successivo che devono subire le sezioni prima d'essere colorate.

La prima idea di questo processo è dovuta a Latteux (1), il quale incluse i capelli nel collodion per farne sezioni. In seguito Duval (2) ha usato l'inclusione nel collodion dei pezzi induriti nell'alcool e trattati poscia coll'etere. Ma il metodo acquistò diffusione dopo che Schiefferdecker (3) ha usato, invece del collodion preparato per l'uso fotografico, la *celloidina*, sostanza simile al collodion, che è posta in commercio sotto forma di lamine solide (4).

La celloidina si scioglie in una miscela a parti eguali di etere e di alcool assoluto. Schiefferdecker consiglia di prepararne due soluzioni, una di consistenza sciropposa e l'altra più tenue, e di immergere gli oggetti prima nella soluzione tenue, e poscia in quella più densa, tenendoli anche precedentemente immersi nell'etere, se sono difficilmente permeabili. Più semplice però è di tenere immerso il preparato, ben disidratato in precedenza nell'alcool assoluto, in una soluzione di celloidina a consistenza sciropposa, per un tempo variabile secondo la grandezza e secondo la natura del tessuto. In generale è da consigliare di fare pezzi piccoli e di lasciarveli per 24-48 ore. Si prepara poscia una cassetta di carta attorno a un pezzo di sughero, nella maniera esposta per l'inclusione in paraffina, e vi si versa dentro la celloidina ed il preparato, disponendolo nella posizione che si desidera. Si lascia evaporare un poco, e quando si è formata alla superficie una pellicola solida di celloidina, si pone nell'alcool al 70-80 %, avvertendo di attaccare al sughero un pezzo di piombo perchè stia sommerso. La celloidina dopo 24-48 ore di soggiorno nell'alcool ha già acquistato la consistenza necessaria per farne sezioni, ed i pezzi si possono conservare nel liquido stesso anche lungamente.

Si può anche porre semplicemente il pezzo imbevuto di celloidina nell'alcool, e quando sia indurito fissarlo sul piatto del microtomo con una goccia di paraffina o colla celloidina stessa.

Per fare le sezioni dei pezzi così preparati, si bagna il coltello coll'alcool ordinario, e poscia, se si vuol togliere la celloidina dai tessuti, si pongono le sezioni stesse nel miscuglio di alcool e di etere a parti eguali, e da qui nell'alcool assoluto per poi colorarle. Volendo ottenere la colorazione dei microrganismi, è necessario fare quest'ultima operazione, giacchè la celloidina si colora

(1) Latteux, *Manuel de technique microscopique*, I, p. 236.

(2) Duval, *Sur l'emploi du collodion humide pour la pratique des coupes microscopiques*, Journ. de l'Anat. et de la Physiol. t. XV. 1879. pag. 185.

(3) Schiefferdecker, *Ueber die Verwendung des Celloidines in der mikroskopischen Technik*, Arch. f. Anat. und Phys., I Abth. 1882, p. 199.

(4) La celloidina si può acquistare dagli stessi fabbricanti o rivenditori che verranno indicati per le materie coloranti.

abbastanza intensamente coi colori d'anilina, mentre invece si colora poco o niente col carmino e coll'ematossilina. Ma quando si vuol fare la colorazione con queste due ultime sostanze, basta mettere le sezioni nell'alcool e nell'acqua, e rischiararle infine coll'olio di bergamotto, o di origano, o di legno di cedro.

Siccome l'olio di garofani scioglie la celloidina, così si consiglia di adoperare altri olii essenziali invece di questo, per rischiarare le sezioni dei pezzi inclusi in celloidina. Si possono però, quando si tratta di tessuti contenenti microrganismi, colorare le sezioni imbevute di celloidina coi colori d'anilina, come d'ordinario, e trattarle poscia coll'olio di garofani, nell'intento di fare sciogliere la celloidina stessa, senza bisogno di immergere prima le sezioni nel miscuglio di alcool e di etere.

3. Apparecchi per la sterilizzazione e per la preparazione delle sostanze nutritive.

Degli apparecchi speciali che si adoperano per lo studio dei microparassiti, alcuni servono per isterilizzare gli oggetti e gli strumenti, altri per la preparazione delle sostanze nutritive e per la sterilizzazione di esse, ed altri infine, detti stufe o termostati, servono per le coltivazioni artificiali dei microbi fuori dell'organismo, le quali debbono essere mantenute a un moderato grado di calore costante. Finalmente ve ne ha pure di quelli destinati alle ricerche speciali dei germi contenuti nell'aria, nell'acqua e nel terreno, ma di questi è meglio fare la descrizione parlando dei relativi metodi di ricerca, specialmente per evitare inutili ripetizioni.

Debbo premettere anzitutto che questi apparecchi, introdotti per la maggior parte da Koch nella tecnica batteriologica, non sono tutti assolutamente indispensabili; dirò anzi che oggidì, volendo porre questi metodi alla portata di tutti, e specialmente dei medici pratici, i quali nei villaggi non possono avere i mezzi e le comodità di un apposito laboratorio, si cerca di ridurre l'uso degli apparecchi speciali al minimo possibile, sostituendone alcuni con oggetti che si possono facilmente avere fra mano, e facendo la sterilizzazione nel modo più semplice, ossia col calore diretto d'una fiamma a spirito o a gas. Tuttavia è da dirsi che, quando le ricerche devono avere una durata transitoria ed uno scopo semplicemente diagnostico, come quando ad es. si tratta di fare la diagnosi di un primo caso di coléra, possono anche le manipolazioni venire semplificate, ed essere tolta così la necessità di apparecchi speciali; ma allorquando si voglia intraprendere uno studio esatto, metodico, e necessariamente continuato per un certo tempo, trattandosi di ricerche in cui si è circondati da cause d'errore innumerevoli, sarà bene di munirsi di tutto il necessario, che permetta di condurre i lavori con quel rigore scientifico, che è la base indispensabile di qualsiasi studio serio.

Del resto bisogna notare che alcuni oggetti, quali l'ago di platino che si usa per i trapianti delle culture, le forbici, i coltelli, alcuni oggetti di vetro e così via, si usa sterilizzarli direttamente sulla fiamma anche nei laboratorî; ma quando, per essere l'oggetto molto voluminoso o difficile a maneggiarsi, o perchè sono molti gli oggetti da sterilizzare, non possiamo servirci con comodo della fiamma per tale operazione, allora è necessario ricorrere ad apparecchi, entro i quali si produce il grado di calore richiesto per ottenere la sterilizzazione degli oggetti che vi sono contenuti.

Per la sterilizzazione col calore secco, l'apparecchio più in uso è la così detta *stufa sterilizzatrice ad aria secca* di Koch, che è una cassetta metallica a doppia parete, fatta generalmente di lamiera di ferro. Uno dei modelli migliori è quello rappresentato dalla figura 4, costruito in modo speciale per ottenere nell'interno dell'apparecchio un riscaldamento uniforme.

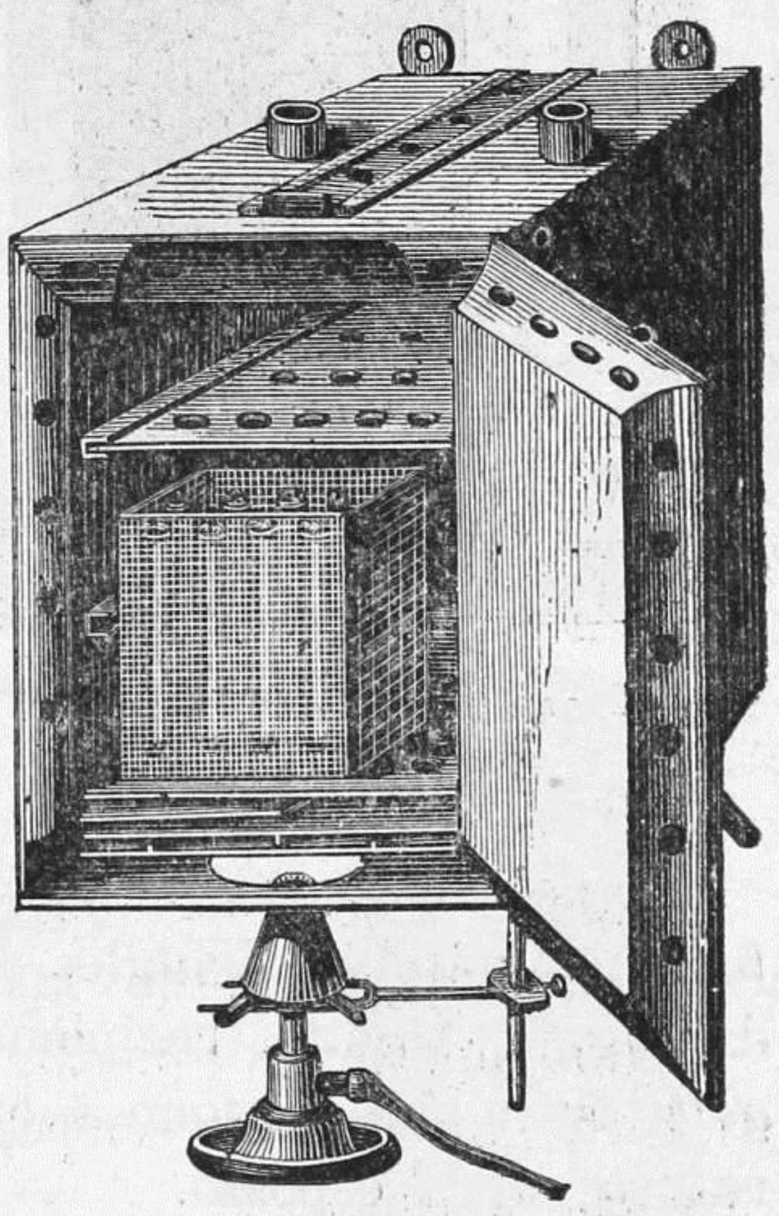


Fig. 4. — Stufa sterilizzatrice ad aria secca di Koch.

La cassetta a doppia parete, provvista dei tubi necessarî per portare il termometro ed il termoregolatore, viene chiusa ermeticamente da una porta, parimente a doppia parete munita di fori, i quali corrispondono, quando si chiude, con quelli che esistono nelle pareti della cassetta, e permettono così la circolazione libera dell'aria in tutto lo spazio interparietale. Nella parte inferiore havvi una specie di anticamera di riscaldamento, formata da due parti sovrapposte; nella parte inferiore di questa l'aria si riscalda in contatto del fondo, sotto il quale arde la fiamma del gas, e passa poscia attraverso la parte superiore forata per andare nello spazio interno. La parete esterna della cassetta ha poi nella parte inferiore un largo foro, attraverso il quale passa la fiamma per andare a toccare il fondo della camera di riscaldamento, mentre nella parte superiore è munita di una serie di fori, sui quali scorre una lamina con altrettanti buchi corrispondenti, destinati a regolare la velocità della circolazione dell'aria contenuta nello spazio interparietale. Quando l'apparecchio è in azione, l'aria riscaldata dell'anticamera passa nello spazio interno, ove sono contenuti gli oggetti da disinfettare, e da qui per le aperture superiori nello spazio interparietale. Nell'interno della stufa sonvi due o più lastre di ferro amovibili, provviste di fori, destinate a sostenere gli oggetti da sterilizzare. L'altezza e la larghezza di questa stufa variano secondo il bisogno. Le pareti possono essere rivestite esternamente di feltro o di asbesto, per limitare la dispersione del calore.

Un altro modello assai comodo di sterilizzatore ad aria secca è quello di Pasteur, la cui costruzione semplicissima

si comprende col solo osservare il disegno (fig. 5), senza bisogno di descrizione. Questo ha specialmente il vantaggio su quello di Koch, che essendo in essa più rapido il riscaldamento, rende necessario per la sterilizzazione un minore consumo di gas.

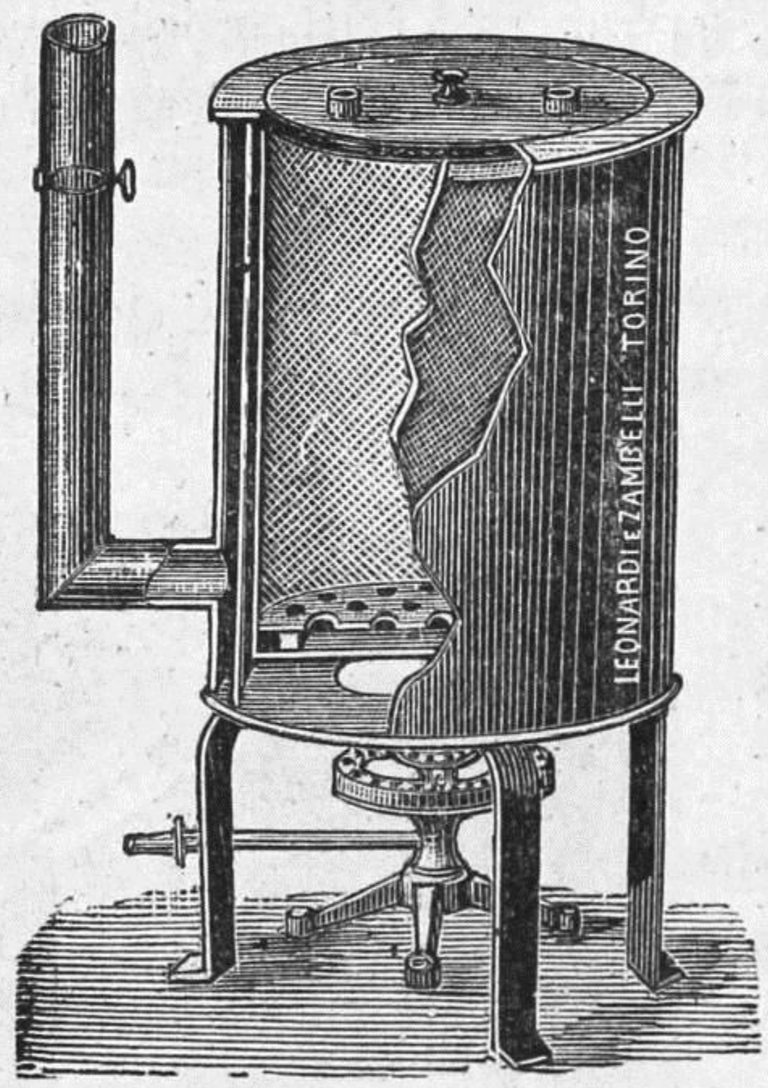


Fig. 5. — Sterilizzatore ad aria secca di Pasteur.

Quando si è costretti a fare economia, si può, come consiglia Salomonsen (1), fabbricare un apparecchio congenere prendendo una scatola di latta da biscotti, di capacità sufficiente, praticando sulla stessa una serie di fori laterali in prossimità del fondo e del coperchio, per la ventilazione, ed un foro centrale in quest' ultimo per il termometro, e ricoprendo di feltro le pareti nello spazio compreso fra i fori.

In questi apparecchi si tengono gli oggetti da sterilizzare da *mezz'ora ad un'ora* (a seconda della grandezza e della natura dell'oggetto) *ad una temperatura di 150° C.*

Il calore secco si adopera per sterilizzare oggetti metallici, forbici, coltelli, siringhe da iniezione, ed oggetti di vetro, tubi da saggio, pipette, recipienti per culture, lastre di vetro, ecc.; oggetti tutti che possono sopportare senza danno il grado di temperatura sopra esposto.

Gli oggetti da sterilizzare non devono stare a contatto del fondo, e si pongono perciò sopra lastre metalliche forate, situate a diverse altezze nell' interno dell'apparecchio. Se si tratta di tubi da saggio, o di altri recipienti chiusi con ovatta, bisogna badare a che l'ovatta non tocchi le pareti metalliche, per evitare che si carbonizzi: se poi gli oggetti devono mantenersi sterilizzati in tutta quanta la loro superficie, come i vetri da orologio e le lastre di vetro, e se non possono essere riparati coll' ovatta da una nuova contaminazione dopo averli ritirati dalla stufa, come è delle scatole di Petri, allora si avvolgono con carta fina e solida prima di porli nell'apparecchio, oppure vi si introducono chiusi entro un recipiente metallico (lastre di vetro, pipette).

Altri oggetti, come la carta da filtro e gli oggetti di gomma, i quali ad una temperatura elevata si alterano, come pure le sostanze nutritive che si adoperano per le culture, le quali egualmente riscaldate a 150° nell' aria secca diverrebbero inservibili,

(1) Salomonsen, *Tecnique élémentaire de bacteriologie*, Paris, 1891.

si sterilizzano invece mediante il *calore umido*, il quale esercita un'azione disinfettante più energica e più pronta del calore secco.

Il calore umido si può adoperare, o sotto forma di ebollizione diretta (liquidi nutritivi), o come bagno maria, tenendo i recipienti che contengono le sostanze da sterilizzare immersi nell'acqua bollente, o finalmente come vapore acqueo semplice (a 100°), o soprariscaldato sotto pressione.

Diciamo subito che i primi due mezzi, ebollizione e bagno-maria, sia perchè difficili a porsi in pratica in molti casi, sia anche perchè non offrono piena garanzia di riuscita, sono da posporsi alla sterilizzazione col vapor d'acqua, il quale è stato per opera delle ricerche classiche di Koch, Gaffky e Löffler (1) dimostrato efficacissimo nella pratica delle disinfezioni.

La superiorità del calore umido su quello secco, come disinfettante, si dimostra specialmente sulle spore, le quali, mentre possono resistere a lungo nell'aria riscaldata anche sopra i 100° C., vengono invece uccise in pochi minuti nell'acqua bollente o nella corrente di vapor d'acqua a 100°. Questo fatto si deve a ciò, che la membrana resistente delle spore, inumidendosi, si rammollisce, e si lascia più facilmente penetrare dal calore. E difatti, se il vapor d'acqua si riscalda senza pressione (non saturo) al disopra di 100°, il suo potere disinfettante diviene presso a poco uguale quello dell'aria calda (2).

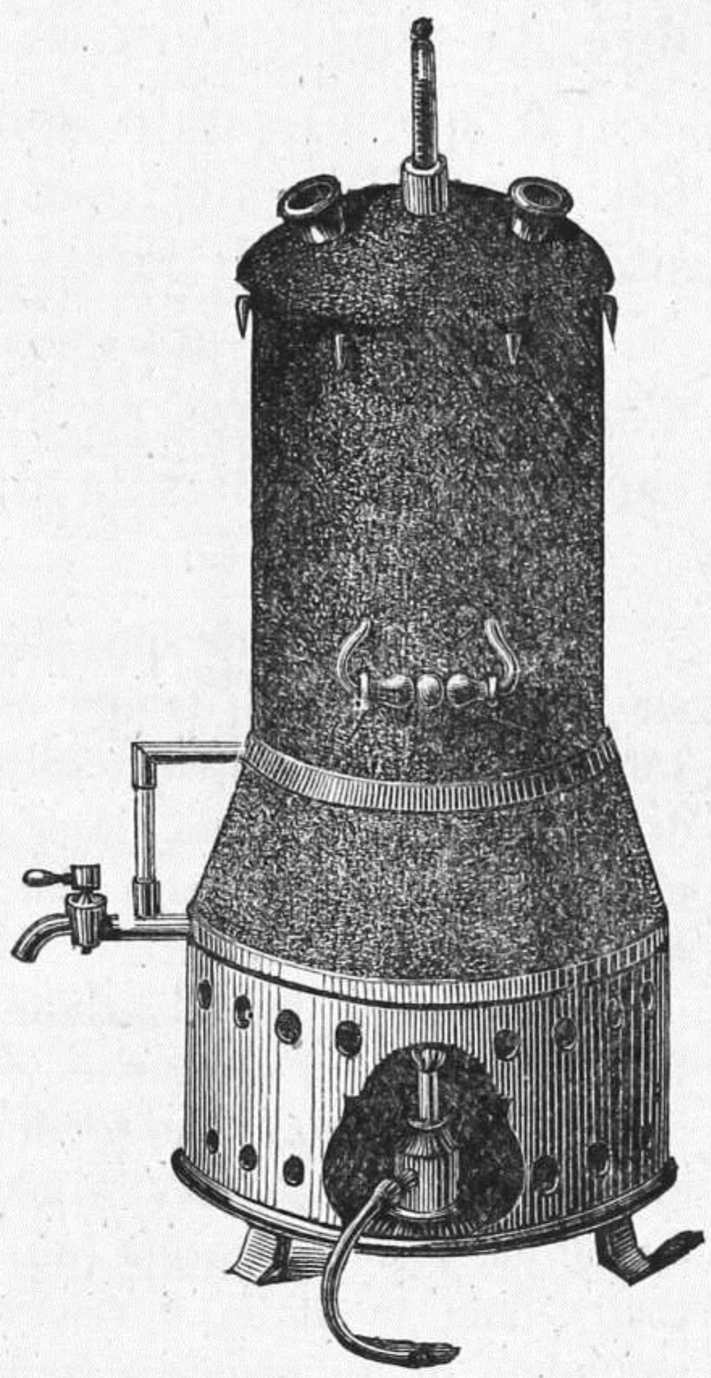


Fig 6. — Apparecchio di sterilizzazione a vapore di Koch.

Il vapor d'acqua si può adoperare in due modi: o come semplice corrente di vapore a 100° C., circa, facendolo sviluppare dall'acqua che bolle in un recipiente aperto, oppure sotto forma di vapore soprariscaldato, fatto sviluppare entro un recipiente chiuso, sotto pressione.

La sterilizzazione colla corrente di vapor d'acqua si ottiene mediante *l'apparecchio di sterilizzazione a vapore* di Koch. Questo consiste essenzialmente (fig. 6) in un bagno d'acqua, a fondo largo perchè

(1) Koch, Gaffky u. Löffler, *Versuche über die Verwerthbarkeit heisser Wasserdämpfe zu Desinfectionszwecken*, Mitth. a. d. kais. Gesundheitsamte, Bd. I, 1881, p. 322.

(2) Esmarch, *Die desinficirende Wirkung des strömenden überhitzten Dampfes*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. IV, 1888, p. 197.

offra una grande superficie di riscaldamento, al sopra del quale sta unito un cilindro di lamiera di zinco, rivestito di feltro o di asbesto esternamente per impedire la dispersione del calore. In fondo a questo cilindro, al disopra del bagno d'acqua, è situata una graticola, destinata a sostenere le cestine coi tubi d'assaggio, o il recipiente per cuocere le patate, o qualsiasi altro oggetto che si voglia sottoporre all'azione del vapore a 100° C. Il coperchio è provvisto di un tubo pel termometro, il quale è infisso in un sughero che ha pure un altro foro per l'uscita del vapore acqueo. Bagno e cilindro riposano su di un sostegno di ferro circondato da un mantello metallico, che impedisce la dispersione del calore e serve a diminuire il consumo del gas.

Per adoperarlo si riempie di acqua fino ai $^3/_4$ circa la parte dell'apparecchio situata al disotto della graticola (il livello dell'acqua è indicato da un tubo di vetro esterno), e si riscalda con una fiamma di gas finchè il vapore che ne esce ha raggiunto i 100°, o, a meglio dire, la temperatura di ebollizione dell'acqua.

A questo punto comincia il tempo utile per la sterilizzazione. Gli oggetti da sterilizzare si pongono per comodità entro un apposito recipiente di latta cilindrico, col fondo fatto a gratella.

Se questo apparecchio è grande, e se si vuole che il vapor d'acqua raggiunga realmente i 100° C., si aggiunge all'acqua una certa quantità di sale di cucina.

A questo primo apparecchio di Koch si sono fatte alcune modificazioni utili, sia pel risparmio di tempo nel riscaldar l'acqua, sia pel minor consumo di gas. I modelli meglio costrutti sotto tali riguardi sono quelli di Hermann Rohrbeck di Berlino (1), alla cui descrizione però rinunciamo per amore di brevità, ed anche perchè nei cataloghi del fabbricante tali apparecchi si trovano minutamente ed esattamente descritti.

Una delle modificazioni più importanti è rappresentata dall'apparecchio di Budenberg qui disegnato (fig. 7), nel quale il vapor d'acqua che si svolge nella camera di sterilizzazione (*c*) si condensa tra la parete di essa e quella del coperchio che la riveste quasi fino in fondo (*efgh*), e sgocciola nella bacinella sottostante (*kl*), da cui passa nella capsula (*ab*) dove entra in ebollizione. Questo apparecchio, la cui costruzione in Italia è riservata alla ditta « Zambelli » di Torino (2), offre il vantaggio di un pronto e facile riscaldamento dell'acqua da evaporare e del provvedimento continuo automatico dell'acqua stessa. Ha però, a mio avviso, lo svantaggio su quello di Koch, che il vapore ristagna alquanto nella camera di sterilizzazione, anzichè passarvi sotto forma di corrente continua, e penetra quindi più difficilmente negli oggetti da sterilizzare.

(1) L'indirizzo di questa casa, che avremo occasione di citare altre volte per la costruzione degli apparecchi batteriologici, è « Berlin N. W. Karlstrasse, 21 ».

(2) Via Ospedale, 16.

Gli oggetti da sterilizzare si lasciano nella corrente di vapor d'acqua entro l'apparecchio di Koch per un tempo variabile da una mezza ad un'ora, a seconda della loro natura, calcolando il tempo dal momento che il termometro segna la temperatura di ebollizione dell'acqua, o che il vapore esce copiosamente dai contorni del coperchio e dal foro del sughero.

L'apparecchio di Koch, oltre ad essere estremamente semplice, poco costoso e di azione sterilizzante sicura, ha pure il van-

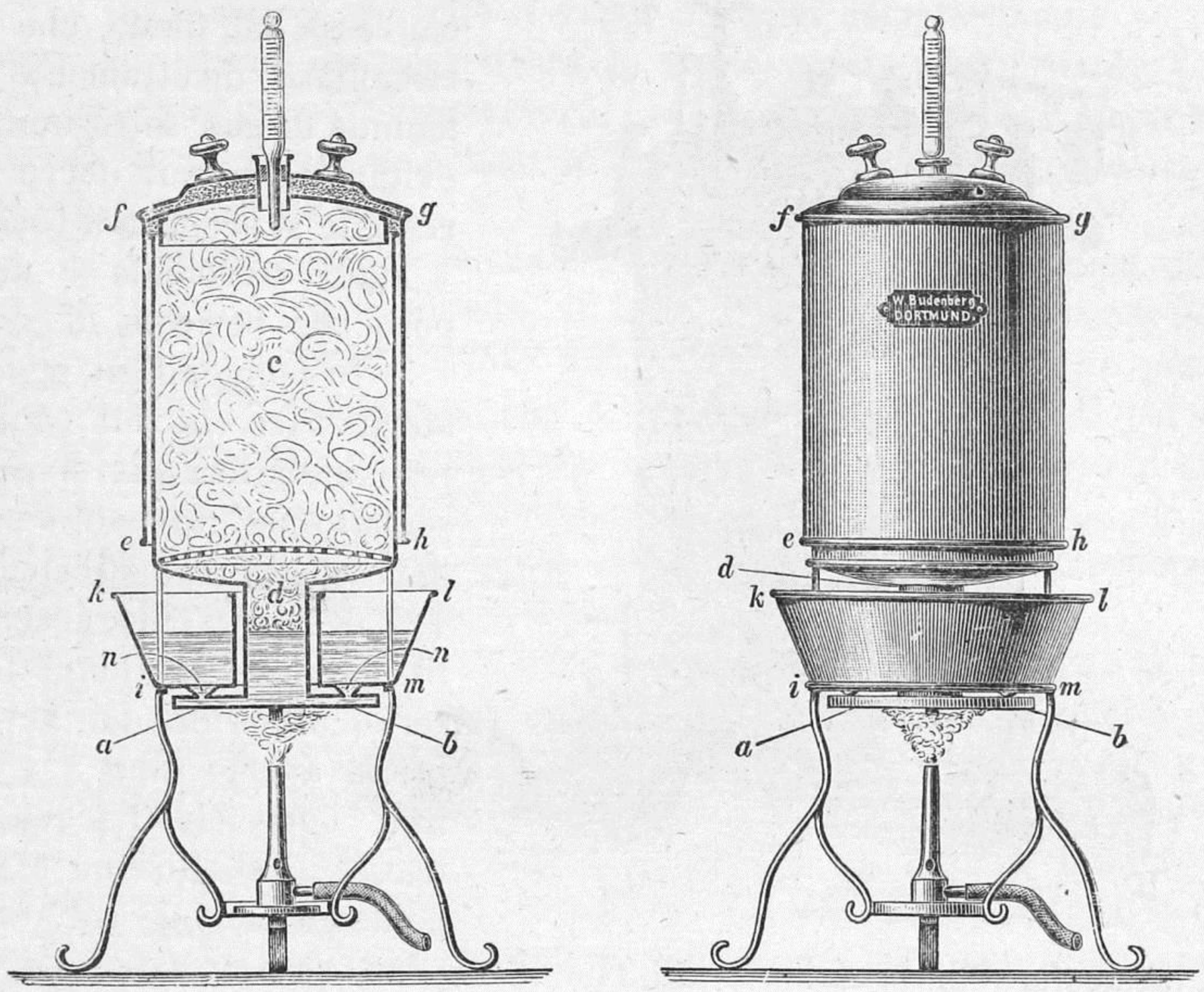


Fig. 7. — Apparecchio di sterilizzazione a vapore di Budenberg.

taggio che in esso resta escluso il pericolo della mescolanza dell'aria col vapore, il che diminuirebbe notevolmente il potere disinfettante di quest'ultimo; e ciò perchè, fuoruscendo il vapore liberamente dal coperchio, viene così scacciata qualsiasi traccia di aria dall'interno dell'apparecchio.

Con tutto ciò il vapor d'acqua semplice, sotto forma di corrente, viene superato in attività e rapidità di sterilizzazione dal vapore d'acqua saturo, riscaldato ad alte temperature sotto pressione. Sotto questa forma infatti viene usato oggigiorno con vantaggio, non soltanto nella pratica delle disinfezioni, ma eziandio nei laboratorî batteriologici, dove si usava già da tempo, caldeggiato specialmente da Nägeli e da Pasteur.

L'apparecchio a ciò destinato, così detto *autoclave*, non è che una modificazione della pentola di Papin, ed è rappresentato dalla fig. 8 nella forma usata nei laboratorî francesi col nome di « autoclave Chamberland ».

Il disegno ci dispensa dal fare una descrizione dettagliata dell'apparecchio. Riguardo al modo di adoperarlo, bisogna anzitutto badar bene a che l'acqua copra esattamente tutta la parte convessa del fondo, che viene riscaldata direttamente dalle fiamme di gas sottostanti, per evitare che sul ferro nudo rovente si produca il così detto « stato sferoidale » del vapore con pericolo di scoppio.

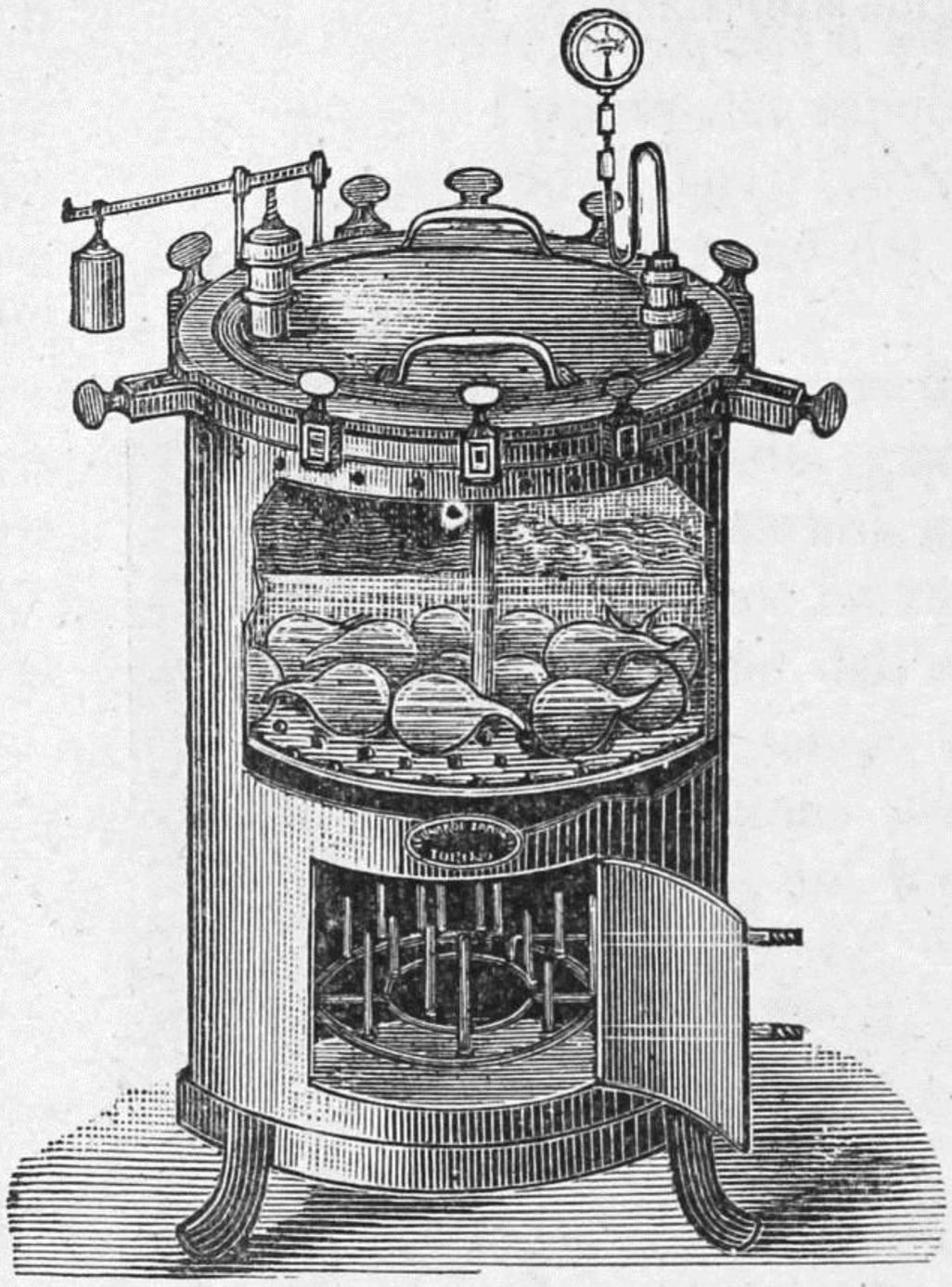


Fig. 8. — Autoclave Chamberland.

Si pongono gli oggetti da sterilizzare entro il paniere di rete metallica che si vede disegnato nell'interno, e si chiudono poscia ermeticamente le viti del coperchio, accendendo le fiamme. Il rubinetto che serve all'escita del vapore si lascia aperto fino a 4-5 minuti dopo che l'acqua è entrata in ebollizione e il manometro segna soltanto un' atmosfera di pressione, affinchè il vapore scacci dall'apparecchio tutta quanta l'aria che vi era contenuta: si chiude poscia il rubinetto, e si riscalda fino alla temperatura di 120° C. circa, mantenendo questa temperatura costante per 10 o 15 minuti, a seconda della natura e del volume degli oggetti da sterilizzare.

Terminata la sterilizzazione, si spengono le fiamme e si comincia a lasciare sfuggire un po' di vapore, aprendo e chiudendo il rubinetto di quando in quando, fino a che la temperatura è discesa a 100° e il manometro segna un'atmosfera. Bisogna badare a non lasciare sfuggire troppo rapidamente il vapore per risparmiar tempo; poichè in tal caso i liquidi contenuti nell'autoclave, diminuendo in questo rapidamente la pressione, entrano in ebollizione e si versano fuori del recipiente che li contiene.

Appena la temperatura è ridotta a 100°, si apre l'apparecchio e se ne estraggono subito le sostanze sterilizzate, per evitare che si

cuocino troppo, specialmente allorquando si tratta di sostanze per culture.

Perchè tali apparecchi col vapor d'acqua sotto pressione funzionino bene, sono necessarie specialmente due condizioni:

1.° che non vi sia aria mescolata col vapore, perchè questa restando a contatto degli oggetti da sterilizzare si dilata ed impedisce che il vapore eserciti su questi la sua azione.

2.° che il vapor d'acqua non si riscaldi al disopra del punto di sua saturazione, giacchè il vapor d'acqua semplicemente soprariscaldato, se non ha addirittura lo stesso potere disinfettante dell'aria secca ad uguale temperatura, come aveva affermato Esmarch, esercita però sempre un'azione inferiore a quella del vapor d'acqua saturo (Teuscher (1)).

Si è detto come si faccia a realizzare nell'uso la prima condizione. Quanto alla seconda, il fatto che il vapor d'acqua nell'autoclave sia soprariscaldato può avvenire per opera delle pareti metalliche dell'apparecchio, che si riscaldano fortemente. È per ciò che tali apparecchi devono avere sul coperchio non soltanto il manometro, come è in quelli francesi, ma anche un termometro, per poter sempre controllare la esatta corrispondenza fra la pressione e la temperatura nell'interno dell'apparecchio.

Se infatti si verifica il soprariscaldamento del vapore, il termometro indicherà una temperatura molto superiore a quella che corrisponde alla pressione del vapore saturo; e inversamente, se avvi aria mescolata col vapore, la temperatura si mostrerà inferiore a quella corrispondente al grado di pressione del vapore saturo.

Il termometro è quindi indispensabile per poter evitare le due cause precipue d'errore, in cui si può cadere nell'uso degli apparecchi a vapor d'acqua sotto pressione.

L'uso dell'autoclave non è adunque così semplice come quello dell'apparecchio di Koch a corrente di vapor d'acqua, giacchè sono necessarie, come si è visto, certe avvertenze le quali richiedono una continua sorveglianza da parte di persona competente, anche per evitare la disgrazia possibile di uno scoppio. Ma con tutto ciò un tale apparecchio non merita i gravi appunti mossigli dalla scuola di Berlino (2), secondo la quale non sarebbe possibile ottenere con esso una disinfezione sicura. Siamo d'accordo con Fränkel nell'ammettere che si tratta di un apparecchio costoso e di difficile maneggio, e che da questo punto di vista è sempre preferibile per l'uso comune di laboratorio l'apparecchio di Koch, giacchè le spore che si possono trovare nei mezzi di cultura, provenienti dall'aria o dall'acqua, non sono in generale così resistenti da non essere uccise dal vapore a 100° C. Bi-

(1) Teuscher, *Beiträge zur Desinfection mit Wasserdampf*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. IX, 1890, p. 492.

(2) V. Fränkel, Opera citata, pag. 58.

sogna però aver sempre presente il fatto, che sonvi alcune spore che nella corrente di vapor d'acqua semplice resistono per qualche ora, mentre in quello saturo sotto pressione muoiono in pochi minuti, e muoiono tanto più rapidamente, quanto più aumenta la pressione del vapore e la sua temperatura. Ricordiamo qui di nuovo l'esempio delle spore di quel bacillo delle patate, la cui resistenza fu studiata da Globig, e che nella corrente di vapore a 100° C. vengono uccise soltanto dopo 5 $^1/_2$ o 6 ore, mentre nel vapor d'acqua sotto pressione a 103-113° vengono uccise dopo 45 minuti, a 113-116° dopo 25 minuti, a 122-123° dopo 10 minuti, a 126° dopo 3 minuti, a 127° dopo 2 minuti e a 130° quasi istantaneamente. Da ciò deriva che, allorquando si voglia sterilizzare rapidamente ed avere la certezza assoluta della purezza dei mezzi di coltura, bisogna ricorrere all'autoclave.

Diciamo infine che l'autoclave si può fare funzionare anche come un apparecchio di Koch, tenendo sempre aperto il rubinetto d'uscita del vapore.

Finora si è detto della maniera di sterilizzare col calore umido a 100° C. ed oltre. Ma sonvi certe sostanze, alcune delle quali importanti specialmente per le culture dei batterì patogeni, le quali non sopportano, senza alterarsi, temperature così elevate. Così il latte riscaldato a 100° diventa leggermente acido, lo zucchero comincia anch'esso ad alterarsi e le sostanze fortemente albuminose, come è appunto il siero del sangue, coagulano e diventano insolubili. Per la sterilizzazione di tali sostanze si mette in pratica il principio, proposto da Tyndall e perfezionato da Koch, della *sterilizzazione discontinua* ad una temperatura di 60-70° C.

Questo processo è basato sul fatto, che la maggior parte dei batterì nella loro forma vegetativa, riscaldati a 60-70° C., muoiono rapidamente, mentre invece le spore restano in vita. Queste però, mantenute qualche tempo a temperatura elevata in un mezzo adatto, rapidamente germogliano; cosicchè, se il riscaldamento alla temperatura suddetta si ripete per qualche volta consecutiva, lasciando fra le singole sterilizzazioni un tempo sufficiente a che le spore germoglino, ad es. 24 ore, dopo un certo numero di volte si è sicuri che tutte le spore esistenti nel liquido da sterilizzare sono germogliate, che tutti i batterì sviluppati vennero uccisi e che quindi i liquidi stessi sono sterilizzati.

L'apparecchio che si adopera per praticare una tale sterilizzazione, che va col nome di « apparecchio sterilizzatore del siero del sangue », perchè appunto serve specialmente per la sterilizzazione di questo liquido, viene rappresentato dalla fig. 9 nella forma più comunemente usata, ideata da Koch.

Esso consta essenzialmente di un cilindro a parete doppia rivestita di feltro, chiuso da ogni parte. Nella sezione verticale si vede che dal centro del fondo si eleva un tubo, che serve a introdurre l'acqua nello spazio interparietale del cilindro, il quale si riem-

pi fino alla metà circa dell'altezza. Lateralmente e in alto trovans alcuni fori, destinati a dar esito a quel po'di vapore che si svolge durante il riscaldamento dell'apparecchio.

Il cilindro è munito d'un coperchio, pure a doppia parete, il quale ha lateralmente un'appendice tubulare, la cui cavità comunica collo spazio interparietale del coperchio stesso, e serve a riscaldare mercè di apposita fiamma l'acqua ivi contenuta. L'acqua che si trova nello spazio interparietale del cilindro viene riscaldata da una seconda fiamma, situata al disotto e circondata da una specie di mantello metallico, come nell'apparecchio di sterilizzazione a vapore. Nel coperchio vi sono tre fori: quello mediano è destinato a ricevere il tubo che si eleva dal fondo del cilindro, e porta u termometro che misura la emperatura dell'acqua conte-

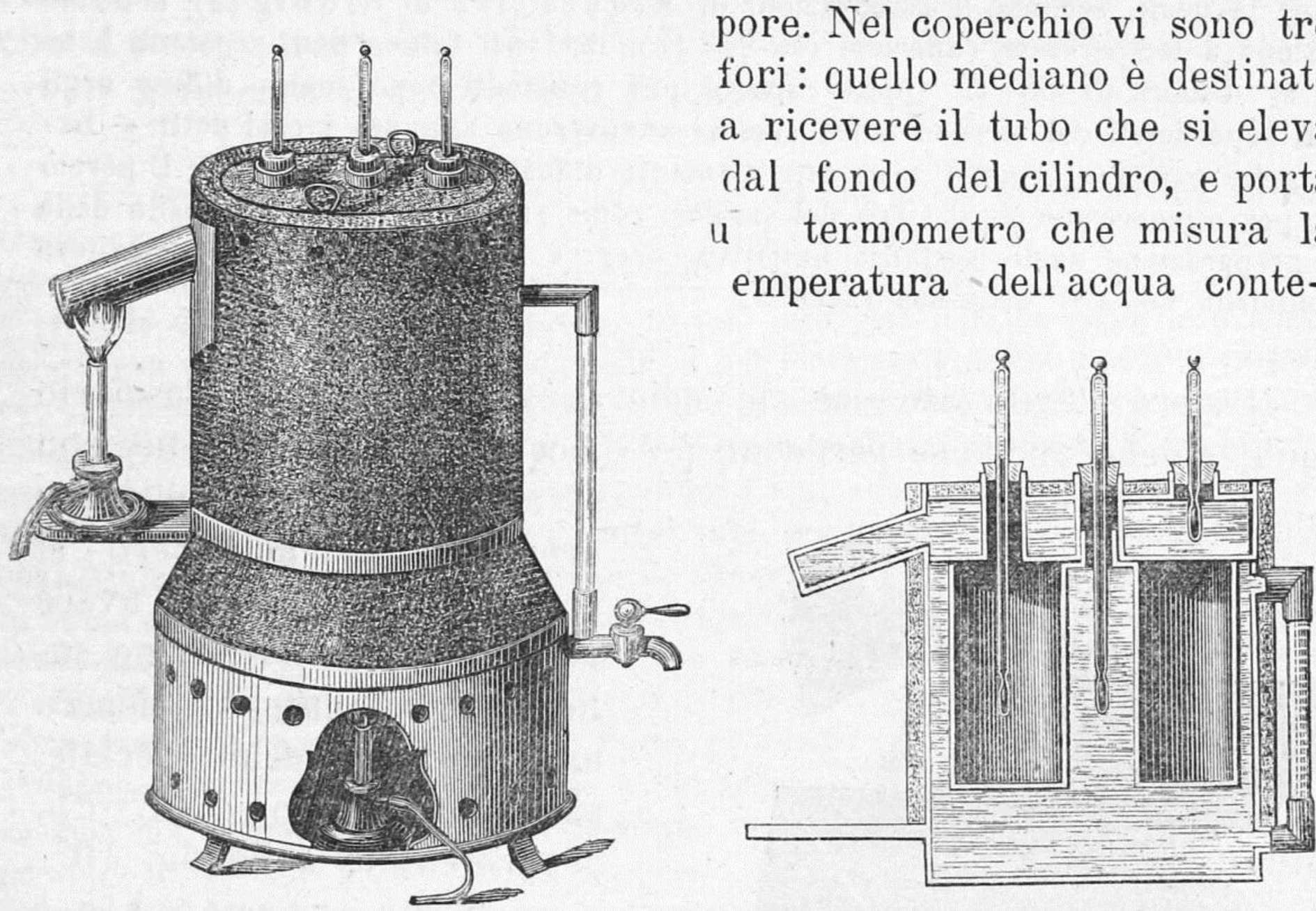


Fig. 9. — Apparecchio di Koch per sterilizzare il siero del sangue.

nuta fra le due pareti di quello; uno dei tubi laterali comunica coll'interno della doppia parete del coperchio, ed anche questo è destinato a portare un termometro che indica la temperatura del l'acqua quivi contenuta; il terzo finalmente attraversa tutto il coperchio, e porta un terzo termometro per osservare la temperatura dello spazio interno del cilindro.

Per mettere in azione l'apparecchio, si riscalda prima a 60° colle due fiamme situate come sopra, e si collocano poscia entro il cilindro i tubi contenenti il siero da sterilizzare, mantenendo costante per 2 ore la temperatura dello spazio interno a circa 58° C., e ripetendo la operazione per sei ad otto giorni consecutivi. La temperatura costante di 58° dev'essere raggiunta dal siero rapida-

mente, e si consiglia per ciò di porre a sterilizzare non molti tubi in una volta. Perchè il siero non si solidifichi e mantenga inalterata la sua trasparenza, ciascuna operazione non deve durare più di 2 ore e la temperatura non deve mai superare i 60 ⁰ C. Quando non si abbia un tale apparecchio, si può supplire con un semplice bagnomaria.

Questo processo di sterilizzazione discontinua non offre una certezza assoluta di riuscita dell'operazione, perchè il principio scientifico su cui è basato non è completamente esatto. E difatti, se la maggior parte delle specie batteriche, nella loro forma vegetativa, vengono uccise dalla temperatura di 60⁰ C., sonvene però alcune le quali, secondo le osservazioni di Miquel (1) e di Globig (2), non solo resistono a temperature superiori (72-74⁰ C.), ma anzi talune non vegetano bene che al disopra di 50⁰ C. Queste specie più resistenti sono molto diffuse negli strati superficiali del terreno e fra esse si annoverano appunto i così detti « bacilli delle patate », i quali sono estremamente diffusi nel mondo esterno. È perciò che, per ottenere sterile il siero del sangue, come si dirà meglio a proposito della sua preparazione quale sostanza nutritiva, occorre badare specialmente di evitare le impurità nell'atto della sua raccolta.

Il siero sterilizzato, se si vuole conservare, è bene lasciarlo liquido, poichè anche se perde un po' d'acqua per evaporazione, non si altera per nulla nelle sue proprietà. Quando però si voglia solidificare per avere un terreno di nutrizione solido e trasparente, si adopera un altro apparecchio speciale, parimente ideato da Koch, rappresentato dalla fig. 10.

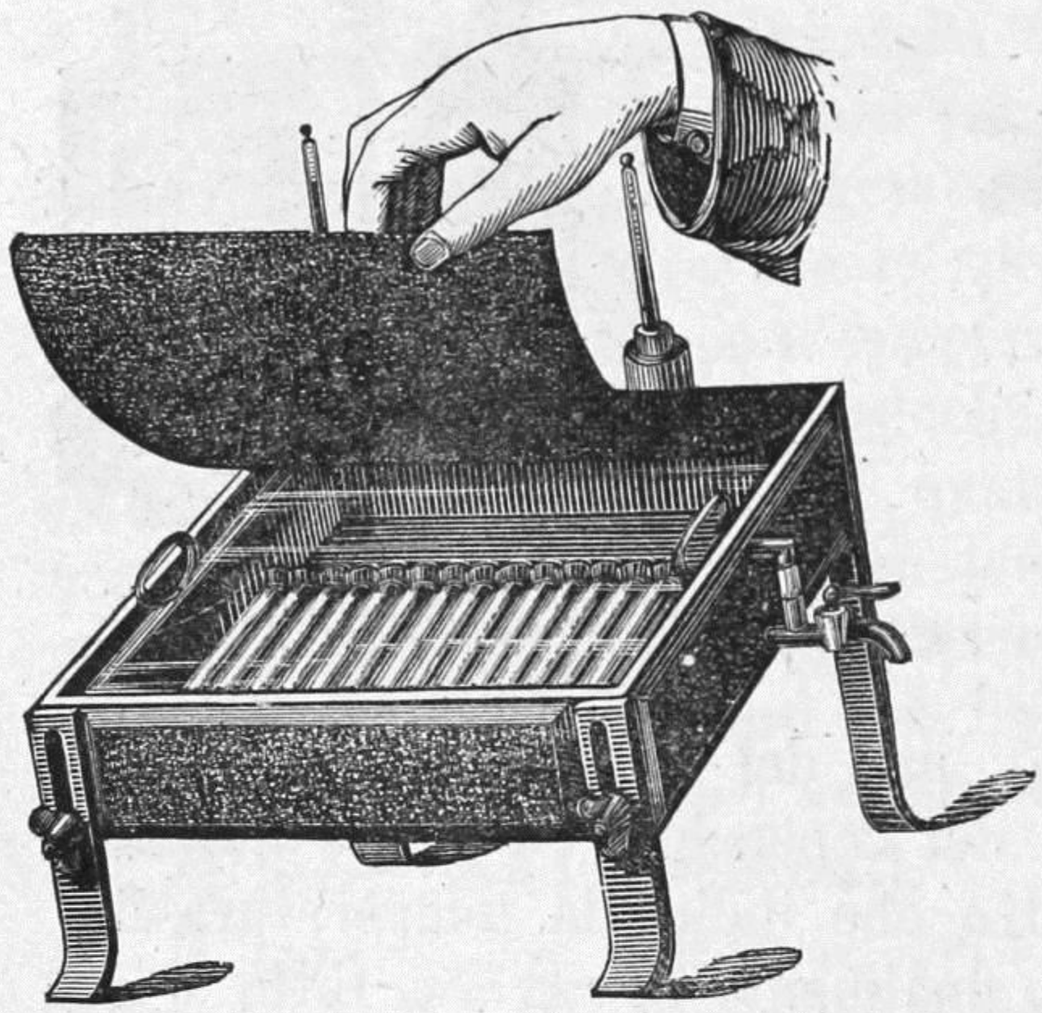


Fig. 10. — Apparecchio per solidificare il siero e l'albumina.

Questo apparecchio è composto da una cassetta metallica a doppia parete, riempita d'acqua e rivestita come al solito di feltro. Nella parte superiore della doppia parete vi sono due piccoli tubi; uno serve per portare il termoregolatore, e l'altro per portare un termometro che misuri la temperatura dell'acqua interparietale. Il coperchio è fatto di vetro, per poter osservare i

(1) Annuaire de l'Observatoire de Montsouris, 1881, p. 464. — *Les Organismes vivants de l'atmosphère*, 1883, p. 182.

(2) Globig, *Ueber Bacterien-Wachsthum bei* 50⁰ *bis* 70⁰, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 3, 1888, p. 294.

tubi che vi sono dentro. Accanto a questi si pone entro la cassetta un altro termometro, per misurare la temperatura dello spazio interno. Per ottenere che il siero del sangue abbia una superficie estesa, più adatta per lo isolamento dei germi che vi si depositano, l'apparecchio è costrutto in modo che i due piedi anteriori della cassetta possono venire accorciati a piacimento, per dare a questa e ai tubi che vi son dentro una posizione obliqua. È evidente allora che il siero del sangue si disporrà entro i tubi obliquamente, e quando è solidificato la sua superficie libera sarà grande più o meno, a seconda della maggiore o minore inclinazione dei tubi stessi. In generale si tiene la cassetta in posizione talmente obliqua, che il siero giunga fino al terzo superiore del tubo, senza però che arrivi a toccare il cotone che lo chiude.

La temperatura a cui il siero del sangue diviene solido senza perdere la sua trasparenza, e il tempo necessario alla sua solidificazione non si possono precisare esattamente, poichè variano a seconda dell'animale da cui fu preso il siero, ed a seconda del suo contenuto di acqua. Si può dire però che in generale il siero del sangue di agnello coagula più presto, e più lentamente invece quello di vitello, che il tempo varia da una a sei ore, e che la temperatura migliore è quella fra 68 e 70° C. pel siero semplice, e di 75-78° per quello glicerinato. È necessario quindi di esercitare un'osservazione continua, agitando di tanto in tanto la cassetta, oppure prendendo in mano i singoli tubi, per vedere se il liquido è divenuto consistente. È da avvertire inoltre che lo stesso siero nei diversi tubi si solidifica in tempi diversi. Appena si è verificato il coagulamento in un tubo, lo si deve subito estrarre, per far sì che resti nel fondo una parte di siero liquido, il quale serve a sopperire alla perdita di acqua che si fa poi inevitabilmente per evaporazione attraverso il piumacciolo di cotone, il che col tempo rende il siero improprio allo sviluppo dei microbi. Se si mantiene a una temperatura fra 65° e 68° C., il siero coagula più lentamente, ma conserva meglio la sua trasparenza; tanto più la temperatura si avvicina a 75° e tanto più presto avviene la coagulazione, ma il siero diventa leggermente opaco. Se poi la temperatura va al di là di 75°, il siero si fa torbido e non è più servibile.

Vi sono anche altri modelli di apparecchi per solidificare il siero, o l'albumina, contenuti nei tubi da saggio; ma siccome non offrono alcun vantaggio notevole su quello ora descritto, rinunciamo a parlarne. Diciamo soltanto che tutti questi apparecchi possono essere sostituiti da una semplice lastra di rame, munita di un bordo scanalato, su cui si adagia la parte superiore dei tubi da saggio; questa lastra si sovrappone ad una pentola dove acqua bolle. Un tale apparecchio semplicissimo si può far costrurre dappertutto e con lieve spesa.

Con tutti gli apparecchi finora descritti la sterilizzazione si compie per opera di temperature, sempre abbastanza elevate. Sonvi

però alcune sostanze, le quali non possono sopportare i gradi di temperatura suddetti senza andare soggette ad alterazione; e queste sono principalmente le sostanze contenenti enzimi, i quali si distruggono già a 55° C., e quelle che contengono saccarosio, il quale a 50-55° C. si converte in zucchero intervertito.

L'apparecchio che serve per isterilizzare le sostanze che non possono essere esposte al calore, e che serve pure per separare i prodotti solubili delle culture dai relativi microrganismi, è il *filtro*.

Il filtro può essere composto di sostanze diverse, come argilla, gesso, porcellana, amianto, terra silicea fossile, le quali corrispondono, in maniera più o meno perfetta, alle esigenze di un'esatta sterilizzazione. La forma più adatta per l'uso pratico è quella del filtro di porcellana Chamberland; e noi qui ci limiteremo alla descrizione di questo, divenuto ormai di uso comune nei laboratori, anche perchè sulla sua bontà si hanno i dati sperimentali più numerosi e più certi.

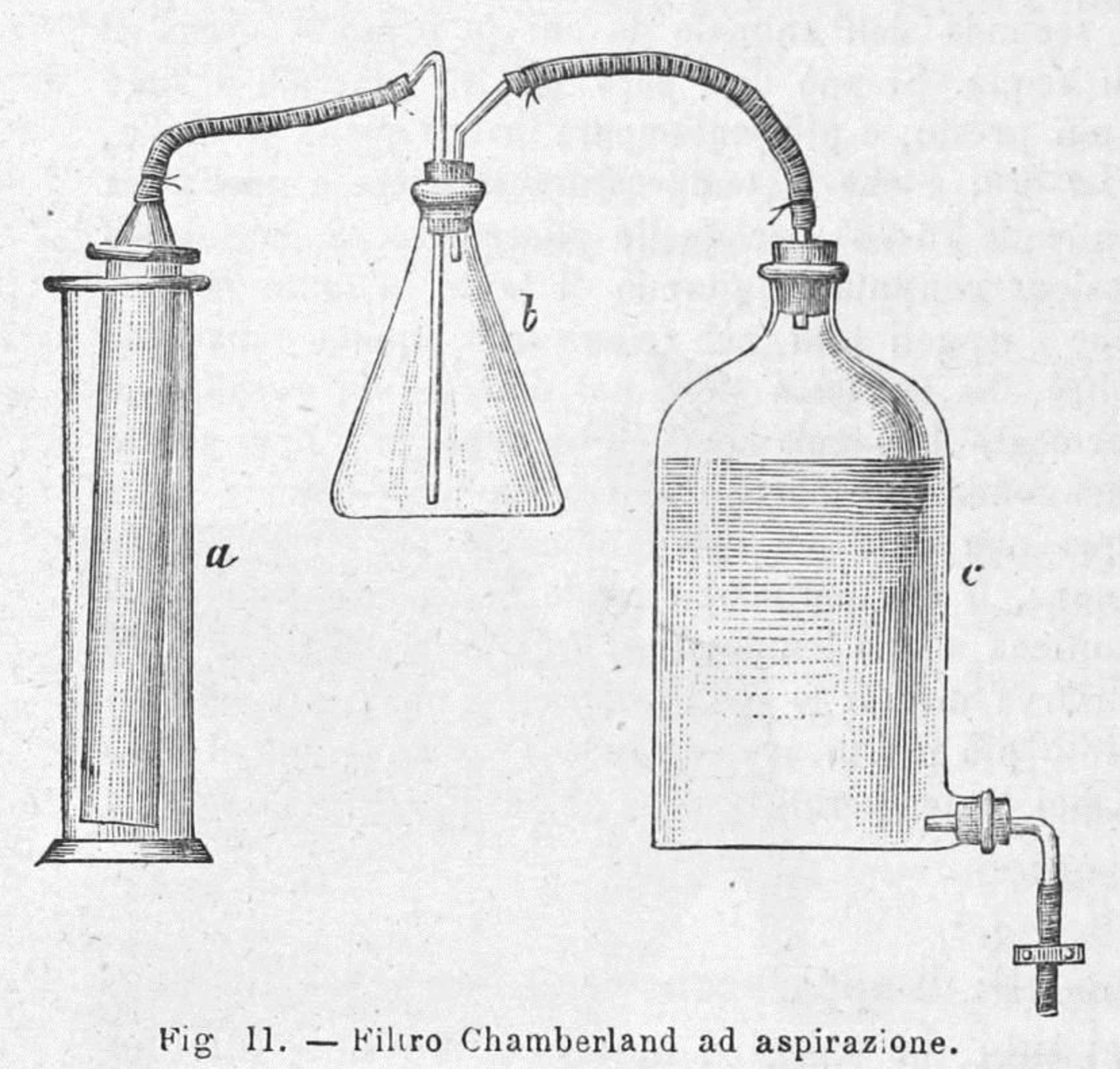


Fig 11. — Filtro Chamberland ad aspirazione.

Esso consta di un cilindro vuoto di porcellana, in forma di candela (*bougie*), chiuso ad un estremo da un fondo piatto e munito all'altro estremo di un'appendice verniciata, a forma di poppatoio, che mette in comunicazione coll'esterno la cavità del cilindro. In questa i liquidi si fanno filtrare attraverso le pareti, o mediante aspirazione, o mediante pressione.

Nel primo caso si può disporre l'apparecchio come è disegnato nella fig. 11.

Il filtro di porcellana pesca nel liquido da filtrare contenuto nel cilindro *a*, ed è messo in comunicazione con una boccetta di Erlenmeyer *b* a doppia tubulatura, dove si pratica l'aspirazione, facendo escire l'acqua dalla bottiglia *c*. Il liquido sterile filtrato si raccoglie nella boccetta *b*.

Prima di adoperare questo filtro è indispensabile anzi tutto assicurarsi che non esistono fenditure nella porcellana; e questo si può fare facilmente, immergendo il filtro nell'acqua e comprimendovi dentro l'aria mediante una di quelle palle doppie di gomma da polverizzatore. Se si vedono bollicine d'aria gorgogliare nell'acqua, ciò indica che esistono fessure nel filtro, e che questo non è servibile. I migliori filtri Chamberland sono quelli segnati colla lettera F.

Bisogna poi in secondo luogo sterilizzare accuratamente il filtro e il recipiente dove si deve raccogliere il liquido filtrato, insieme coi tubi che servono a tenerli uniti. Se si possiede un autoclave, l'operazione è presto fatta mettendo a sterilizzare

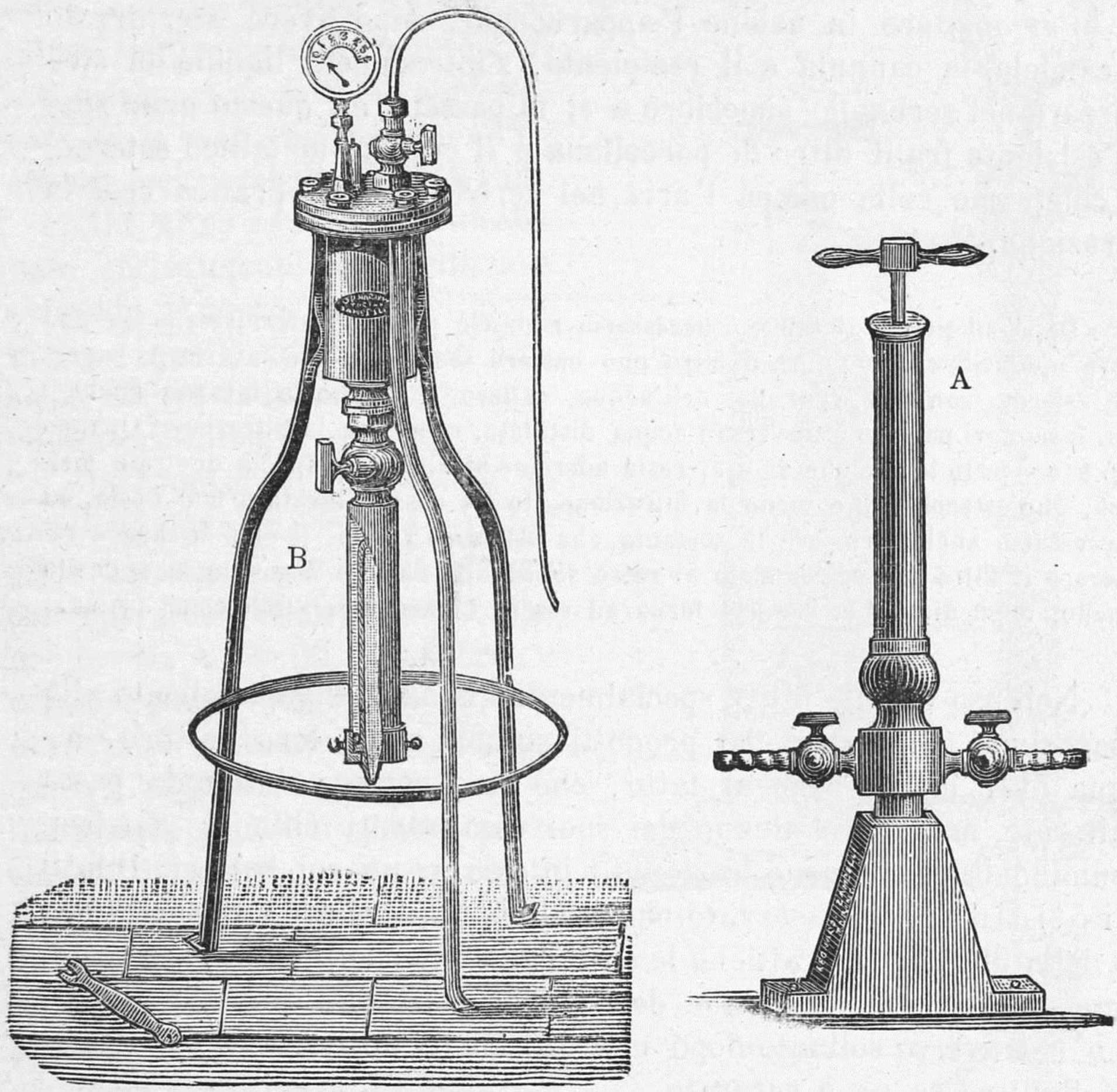


Fig. 12. — Filtro Chamberland a pressione.

tutto insieme per 15 minuti nel vapor d'acqua a 120°; altrimenti bisogna prima sterilizzare separatamente il filtro, la boccetta d'Erlenmeyer e i tubi di vetro nell'aria secca a 150°, e i tubi e il tappo di gomma nel vapor d'acqua a 100°, e riunire poscia le diverse parti con ogni precauzione e colle mani bagnate di una soluzione disinfettante.

Per fare l'aspirazione nella boccetta d'Erlenmeyer, specialmente quando si vuol far presto, si suole adoperare una pompa aspirante, ad aria o ad acqua.

Per filtrare mediante pressione si adopera generalmente l'apparecchio rappresentato dalla fig. 12, composto di una pompa premente ad aria A, e dell'apparecchio filtrante B. Questo si compone di un serbatoio superiore munito di manometro, dove si introduce il liquido da filtrare, e di un cilindro metallico inferiore, nel cui interno è contenuta la candela Chamberland, la quale colla sua estremità libera è posta in comunicazione mediante una cannula con un recipiente sterilizzato, dove si raccoglie il liquido filtrato.

Per mettere in azione l'apparecchio, dopo avere sterilizzato la candela, la cannula e il recipiente, s'introduce il liquido da sterilizzare nel serbatoio superiore e si fa passare da questo nello spazio esistente fra il filtro di porcellana e il cilindro metallico esterno. Si comprime colla pompa l'aria nel serbatoio, e si pratica così la filtrazione.

Dopo adoperato il filtro, è necessario ripulirlo prima di sterilizzarlo per una nuova operazione. Per pulire il filtro può bastare semplicemente lavarne la superficie esterna con una spazzola nell'acqua, oppure è necessario lavarne anche i pori, facendovi passare attraverso l'acqua distillata, come per la filtrazione. Quando però è un certo tempo che si usa, resta aderente al filtro una specie di strato melmoso, che ostacola più o meno la filtrazione. In tal caso la lavatura non basta, ed è necessario anche bruciare la sostanza che ostruisce i pori, il che si dice « rigenerare il filtro », riscaldandolo al rosso sopra una fiamma a gas, o in apposito fornello, dopo di che la candela torna ad essere bianca e servibile come prima.

Nell'uso di tale filtro, specialmente quando venga applicato alla separazione dei batterî dai prodotti solubili delle loro culture, bisogna aver mente bene al fatto, che non sempre il liquido passa inalterato, ma talora alcuno dei suoi componenti chimici (diastasi, albuminoidi, ecc.) viene trattenuto in esso in un coi batterî. Difatti Sirotinin (1) ha osservato che il filtro Chamberland, nello inizio della filtrazione, trattiene le sostanze chimiche a molecole grosse, come sono appunto le tossine dei batterî, e che tali sostanze vi passano a traverso soltanto dopo una filtrazione prolungata, ossia dopo che il filtro se ne è saturato.

Il filtro di porcellana si può anche adoperare per la filtrazione e sterilizzazione dell'acqua da bere, ma ha l'inconveniente di dovere essere spesso ripulito e rigenerato anche col calore.

Un altro filtro che corrisponde bene alle esigenze di una rigorosa sterilizzazione, e che ha la stessa forma di candela del filtro Chamber-

(1) Sirotinin, *Ueber entwickelungshemmenden Stoffwechselproducte der Bacterien und die sog. Retentionshypothese.* — Anhang, *Notiz über die Wirkung Pasteur'scher Filter auf Alcaloïdlösungen*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 4, 1888.

land, è il filtro di Nordtmeyer-Berkefeld, composto di terra silicea fossile (diatomee), il quale fatto agire sotto pressione, secondo le osservazioni di Nordtmeyer (1), di Bitter (2) e di Weyl (3), sarebbe anche superiore a quello di Chamberland, sia per la facoltà di trattenere i microbi, come specialmente per la rapidità di filtrazione. Ha però lo svantaggio di essere più difficilmente sterilizzabile, perchè tanto col calore secco come nella corrente di vapor d'acqua facilmente si rompe. La ripulitura di tali filtri, nei modelli più perfezionati, si fa meccanicamente all'esterno, per mezzo di spazzole rudi.

Un altro apparecchio, destinato specialmente a sterilizzare a freddo i liquidi organici normali, è quello ideato da D'Arsonval (4) e da lui chiamato «sterilizzatore-filtro ».

In questo apparecchio la sterilizzazione si compie in duplice maniera: per *via chimica* per opera dell'anidride carbonica compressa a 50-60 atmosfere, e per *via fisica* per mezzo di una candela di porcellana o di allumina. L'anidride carbonica si ottiene facilmente a quella pressione, facendola svolgere sotto forma gassosa, dopo averla liquefatta entro un apposito recipiente.

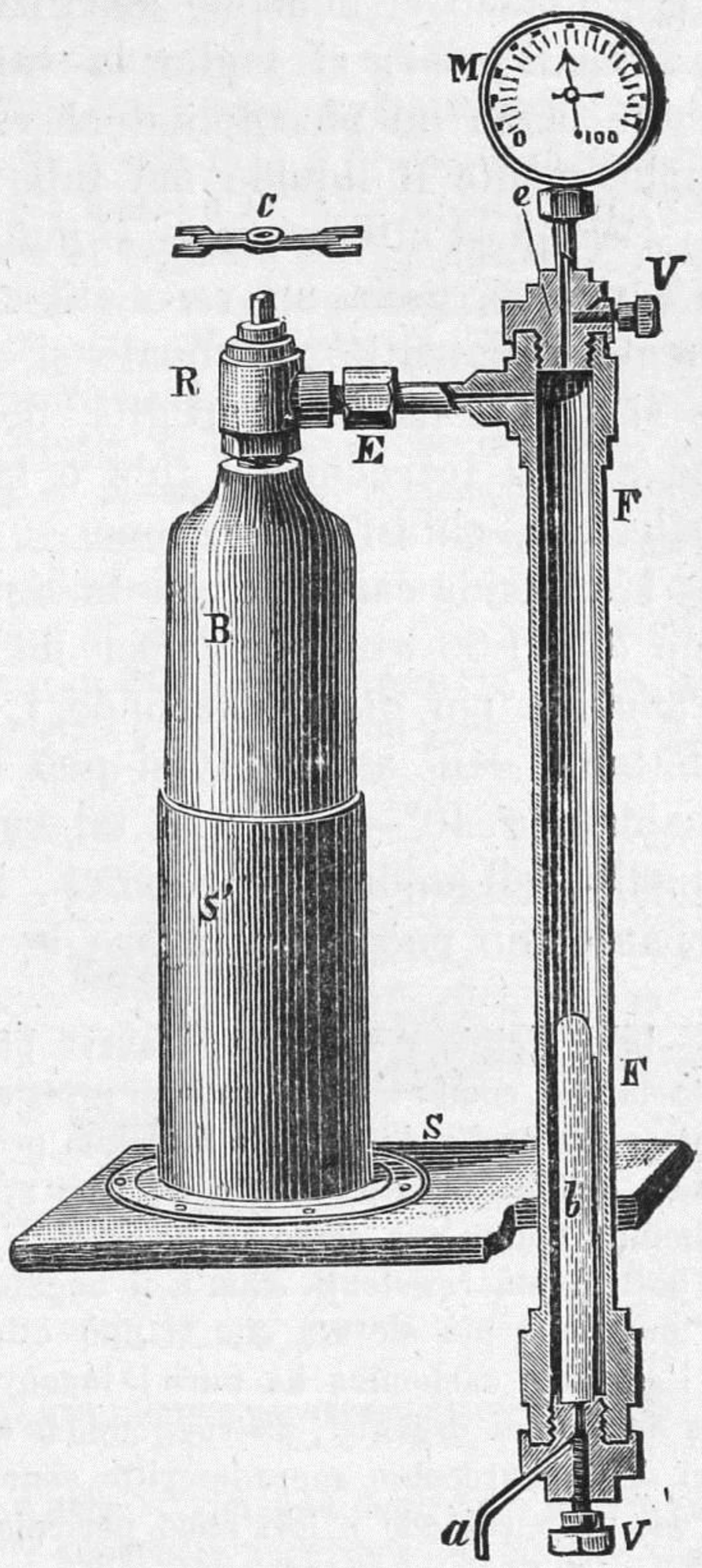


Fig. 13. — Sterilizzatore-filtro D'Arsonval.

Per mettere in azione l'apparecchio qui disegnato (fig. 13), si comincia dal versare il liquido da sterilizzarsi nel tubo F, si chiudono ermeticamente tutte le aperture, e si apre il rubinetto R del serbatoio B che contiene l'anidride carbonica liquefatta. Il gas si precipita a contatto del liquido, e se ne

(1) Nordtmeyer, *Ueber Wasserfiltration durch Filter aus gebrannter Infusorienerde*, Zeitschrift f. Hygiene 1891, Vol. X, pag. 145.

(2) Bitter, *Die Filtration bacterientrüber und eiweisshaltiger Flüssigkeiten durch Kieselguhrfilter* Ibid, pag. 155.

(3) Weyl, *Die Kieselguhrfilter als Hausfilter*. Berl. klin. Wochenschr. N 23, 1892.

(4) D'Arsonval, *Stérilisation à froid des liquides organiques par l'acide carbonique liquéfié*, Archives de Physiologie norm. e path., N° 2, 1892.

gradua la pressione a volontà, seguendo le indicazioni del manometro; si lascia il liquido sotto pressione pel tempo che si crede necessario, e poscia si apre il rubinetto V^1, raccogliendo in un recipiente sterilizzato, posto in comunicazione col tubo *a*, il liquido che filtra attraverso la candela *b*.

Quando si ritiene sufficiente la sola sterilizzazione chimica, come, ad es., quando si debbono sterilizzare i liquidi organici provenienti da animali sani, si toglie la candela filtrante e si usa l'apparecchio come un piccolo autoclave ad anidride carbonica, versando semplicemente il liquido nel tubo F.

Per quest'ultimo scopo si può anche usare un altro apparecchio più semplice, ossia un vero autoclave metallico, a pareti sufficientemente resistenti, nel quale si fa arrivare l'anidride carbonica che si svolge da una bottiglia, dove è contenuta allo stato liquido, dopo avervi introdotto i tubi o le boccette contenenti i liquidi da sterilizzare, chiusi con cotone.

L'anidride carbonica si fa agire, come si è detto, ad una pressione di 50-60 atmosfere, per un tempo variabile da 1 a 24 ore, od anche a più giorni, secondo i casi. Per aumentare il potere disinfettante dell' anidride, si può immergere l'autoclave nell'acqua riscaldata a 40°-45° C.; in tal caso si aggiunge l'azione del calore a quella dell'anidride carbonica, la cui pressione nell'interno dell'apparecchio può raggiungere le 90-95 atmosfere.

In principio d'Arsonval aveva proposto di usare per la sterilizzazione soltanto la CO^2 compressa al grado di pressione sopradetto. Egli ha più tardi aggiunto al suo apparecchio la candela filtrante, probabilmente in seguito alle critiche mosse al suo metodo da Nocard e da Roux, i quali hanno dimostrato che l'anidride carbonica compressa serve ad uccidere i batterî senza spore, ma è inattiva invece sui batterî più resistenti, com'è il bacillo della tubercolosi, e sulle spore, anche alla pressione più elevata che si può ottenere mediante il riscaldamento. Oltre a ciò l'anidride carbonica ha pure l' inconveniente di alterare la composizione chimica dei liquidi organici, distruggendo le albumosi e gli enzimi. È perciò che i vantaggi dell'apparecchio sopradescritto sono ancora assai dubbi, tenuto conto anche dell'uso poco comodo e fors'anco pericoloso.

4. Stufe per culture, o Termostati. — Termoregolatori.

Per mantenere le culture ad una temperatura moderata e costante, che ne favorisca lo sviluppo, si hanno i così detti *termostati*, o *stufe a temperatura costante*.

Ve ne sono di varie specie. La forma più semplice è costituita da una cassetta quadrangolare, a doppia parete piena d'acqua, fornita di un termometro e di un termoregolatore. Vi sono però molti al-

tri termostati, nei quali la temperatura interna è più uniforme e più costante; e fra questi uno dei più antichi, ed anche dei migliori, è quello di d'Arsonval, di cui il modello primitivo è rappresentato dalla fig. 14.

Nella figura si vedono disegnati separatamente il primo modello dell'apparecchio d'Arsonval e il termoregolatore a membrana, di Schlösing, che vi è unito.

Il primo è composto da un cilindro a parete doppia, con un largo spazio intermedio, destinato a ricevere una grande quantità di acqua; questo cilindro si continua in basso con una superficie di riscaldamento conica, a parete doppia, che termina in un tubo piuttosto largo. Il fondo di questo tubo è provvisto di fenditure, le quali si possono allargare e restringere per mezzo d'un disco mobile, munito esso pure di fenditure corrispondenti, e servono a regolare l'ingresso dell'aria nell'interno della stufa. Nel punto d'unione della parte cilindrica colla parte conica dell'apparecchio è situata nell'interno una graticola, sopra cui si posano i vasi contenenti le culture. Lateralmente, vicino al margine superiore del cilindro, trovasi il termoregolatore a membrana di caoutchouc, qui sotto descritto. Si riempie dal foro superiore lo spazio interparietale del cilindro con acqua bollita (priva

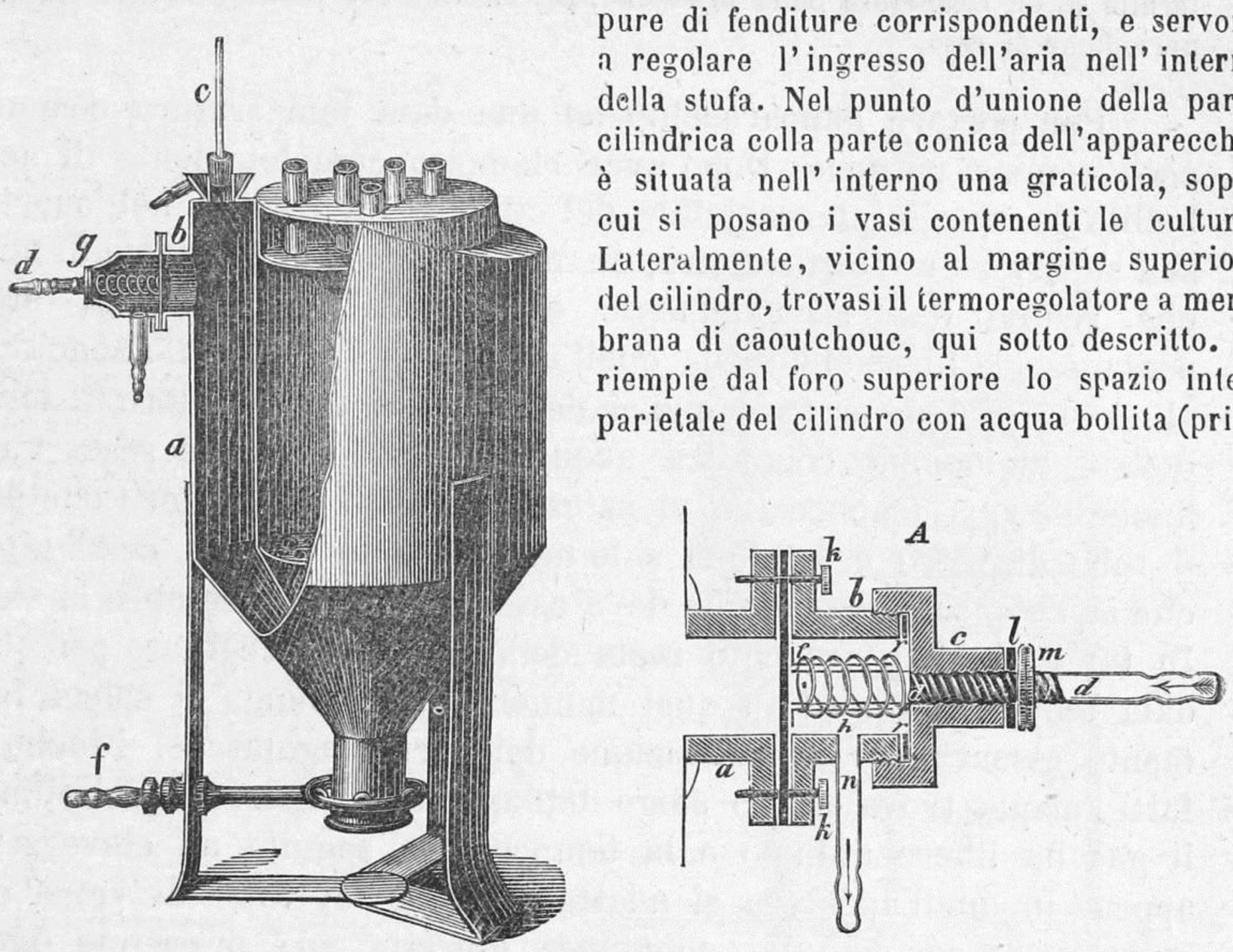


Fig. 14. — Stufa d'Arsonval, primo modello, con relativo termoregolatore (Schlösing).

d'aria), in modo che neppure una bolla d'aria vi rimanga dentro; e questo si ottiene mediante la disposizione obliqua della superficie superiore del cilindro stesso.

Il coperchio è parimente a parete doppia ed è fornito di quattro fori, dei quali due lo attraversano in tutto il suo spessore, e due immettono nella cavità interparietale del coperchio stesso. Quest'ultimo si riempie di acqua, e se ne misura la temperatura con un termometro posto in uno dei fori anzidetti. Con un altro termometro, che attraversa tutto il coperchio, si misura la temperatura dello spazio interno della stufa.

Il termoregolatore a membrana di Schlösing (Fig. 14 A) consta essenzialmente di due camere *a* e *b*, di cui la prima (*a*), fissata al cilindro, è in comunicazione colla cavità interparietale del medesimo, piena d'acqua, ed è divisa dalla camera propria del termoregolatore (*b*) per mezzo di una membrana di caoutchouc,

disegnata nella figura come una linea oscura, la quale è tenuta distesa da sei viti (*k*). Alla camera *b* è unita ermeticamente mediante alcune viti la capsula *c*, entro la quale scorre, per mezzo d'una vite e di una madrevite, il tubo *d* che serve per l'afflusso del gas. Nella porzione interna di questo tubo scorre a dolce sfregamento un altro tubo sottile, sovrapposto (*f*), che termina con una lamina, la quale è spinta contro la membrana di caoutchouc per mezzo della spirale *h*. Il tubo *d* ha, poco lungi dall'apertura interna, un piccolo forellino di 1/2 millimetro di larghezza, che permette il passaggio del gas anche quando la membrana chiude completamente la estremità del tubo stesso, facendo sì che le fiammelle disposte a cerchio sotto la stufa possano bensì diventar piccole, ma non spegnersi del tutto. Un tubo di caoutchouc deve porre in comunicazione il tubo di deflusso *n* del termoregolatore col tubo *f*, fissato alla parte inferiore della stufa, che porta le fiammelle; un altro tubo deve collegare quello di afflusso *d* colla sorgente del gas, la quale deve essere fornita di un regolatore della pressione, per eliminare l' influenza delle oscillazioni periodiche di essa.

Per portare l'apparecchio ad una data temperatura costante, ecco come si procede. Dopo aver riempito completamente di acqua bollita lo spazio interparietale del cilindro, si colloca nell'apertura sua superiore un termometro, in modo però che l'eccesso di acqua che risulta dal riscaldamento e dalla dilatazione della stessa possa escire liberamente da quell'apertura. Si riscalda l'acqua fino al grado di temperatura che si desidera; si toglie allora il termometro, si riempie con altra acqua lo spazio che ne resta vuoto, finchè l'acqua trabocca, e vi si caccia dentro un sughero che porta il tubo di vetro *c*. L'acqua sale nel tubo fino ad una certa altezza che si deve segnare, perchè deve essere mantenuta sempre la stessa. In tal guisa l'apparecchio resta definitivamente regolato per quella data temperatura, ed in qual maniera ciò avvenga si spiega facilmente osservando la costituzione del termoregolatore. Finchè infatti l'acqua trova libero sfogo dall'apertura superiore del cilindro, il gas ha libero afflusso e la temperatura seguita ad elevarsi; ma appena in quell'apertura si adatta il tappo col tubo di vetro *c*, la colonna di acqua quivi contenuta esercita una pressione ognora crescente sulla membrana di caoutchouc, pressione che vincendo la elasticità della spirale opposta, spinge sempre di più la membrana presso l'orifizio del gas, regolandone in tal modo l'escita.

Nel momento in cui si toglie il termometro e si colloca il tubo, la membrana deve andare a toccare l'apertura interna del tubo di afflusso del gas, sicchè questo non passa più che per la piccola apertura del tubo che è larga $^1/_2$ mm., e le fiammelle diventano perciò nell'istesso istante più piccole. Se questo non accade, ciò vuol dire che il tubo di afflusso *d* trovasi troppo distante dalla membrana di caoutchouc, ed allora non si ha che avvitare il tubo stesso finchè si vedono le fiamme diminuire, e fissarlo in questa posizione per mezzo della piccola controvite *m*.

Una volta regolato l'apparecchio per una certa temperatura, si possono spegnere e riaccendere ripetutamente le fiamme e si è sicuri di ottenere sempre di nuovo il medesimo grado di calore. Soltanto bisogna badare a che la colonna d'acqua nel tubo *c* abbia sempre la stessa altezza, segnata al momento in cui si pone nell'apparecchio, perchè eserciti sempre la stessa pressione sulla membrana di caoutchouc; e siccome per evaporazione si perde acqua continuamente, bisogna di quando in quando aggiungerne fino all'altezza stabilita.

Il termoregolatore ora descritto è abbastanza esatto, poichè con esso si possono le oscillazioni della temperatura limitare a 0,1-0,2° C.; ha pero un inconveniente, ed è che la membrana di caoutchouc dopo un certo tempo si altera e perde la sua elesticità, ed è necessario allora cambiarla. Per ovviare a ciò, ed anche nell'intento di ottenere una regolazione più esatta della temperatura, d'Arsonval ha costruito un nuovo modello del suo termostato, disegnato nella fig. 15, nel quale l'apertura, invece d'essere superiore, è laterale, ed il termoregolatore invece che lateralmente è situato al fondo della stufa, e può quindi più facilmente risentire gli effetti delle modificazioni di pressione, prodotte dalle differenze di altezza della colonna di acqua nel tubo di vetro superiore. Oltre a ciò, la membrana di caoutchouc è sostituita da un' altra metallica, simile a quella dei barometri aneroidi.

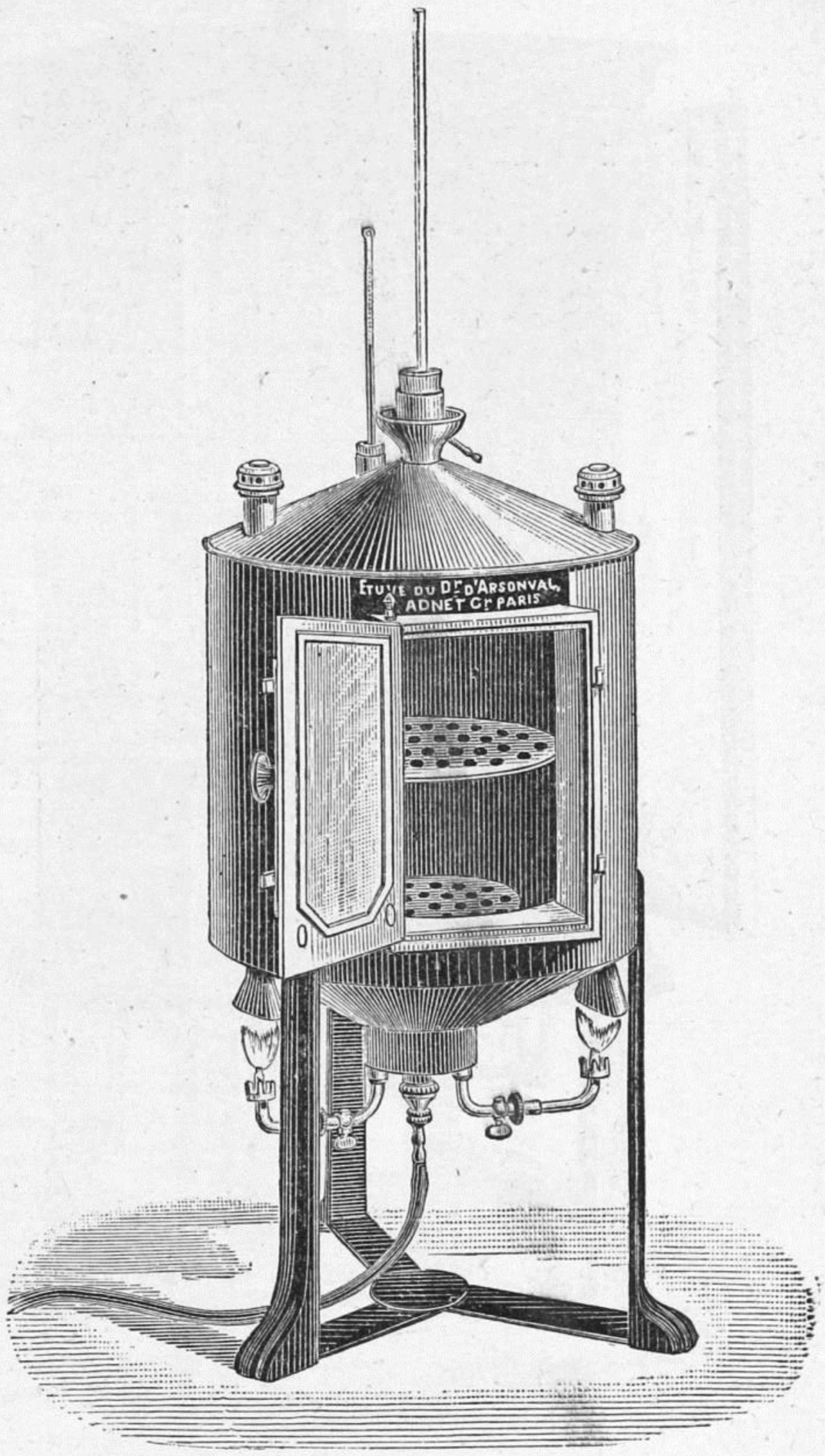


Fig. 15. — Stufa d'Arsonval, nuovo modello.

Per mia esperienza questo nuovo modello, mentre ha su quello primitivo i vantaggi dell'uso più comodo per l'apertura laterale e della più esatta regolazione del calore, offre però lo svantaggio che nell'interno dei caminetti, che attraversano la doppia parete della stufa, e nei quali passano l'aria riscaldata e i prodotti di combustione del gas, avviene un'ossidazione del rame così rapida, che dopo qualche mese la loro parete è usurata in modo da lasciare uscir l'acqua contenuta nello spazio interparietale. A tale inconveniente si può però riparare otturando i caminetti, e facendo così riscaldare dalle fiamme il fondo dell'apparecchio.

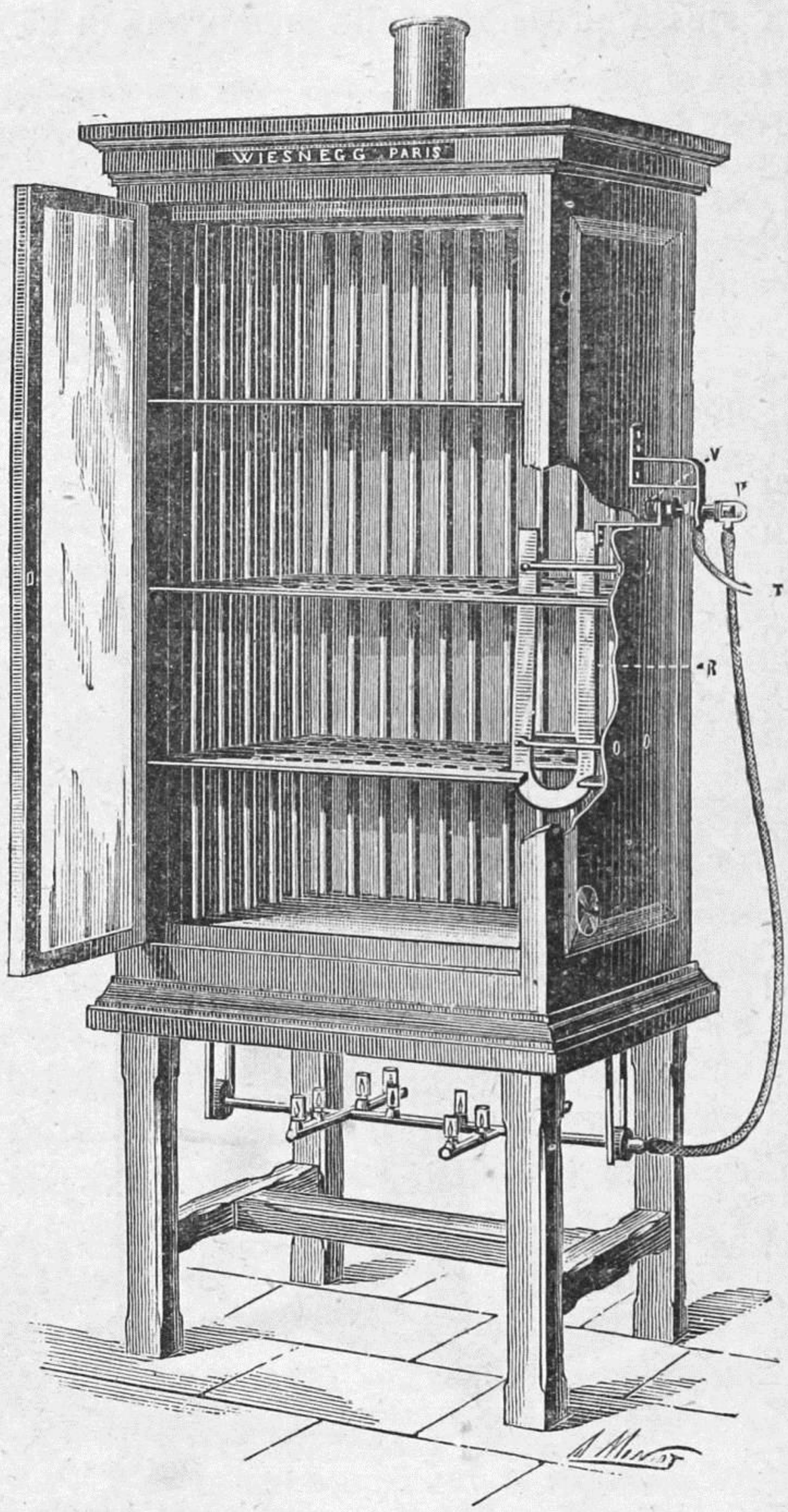


Fig. 16. — Stufa Pasteur-Roux.

Uno dei modelli di termostato più da raccomandarsi è quello di Pasteur, modificato da Roux (fig. 16), nel quale il riscaldamento si fa direttamente per mezzo del gas, i cui prodotti di combustione, passando attraverso una serie di tubi verticali disposti sulla parete posteriore della stufa, producono un riscaldamento regolare ed uniforme dell'aria in essa contenuta. Il termoregolatore metallico di tale stufa, ideato da Roux, è composto da due lastre, una di zinco e l'altra di acciaio, ricurve in forma di U, e funziona egregiamente bene (1).

Altri termostati, molto in uso oggidì, ma di prezzo più elevato dei precedenti, sono: quello di Rohrbeck (fig. 17) costruito in forma ovale per evitare gli angoli morti, e per avere così una distribuzione più uniforme della

(1) Di questi termostati, costruiti dalla casa Wiesnegg di Parigi (Rue Gay-Lussac, 64) il modello grande, alto m. 1,25 e largo m. 0,69, costa L. 550, quello medio alto m. 0,89 e largo m. 0,45, costa L. 450, e il modello piccolo, alto m. 0,52 e largo m. 0,28, L. 175.

temperatura, e quello di Hueppe costruito, secondo le norme da questi stabilite, per opera di Muencke di Berlino (1), nel quale

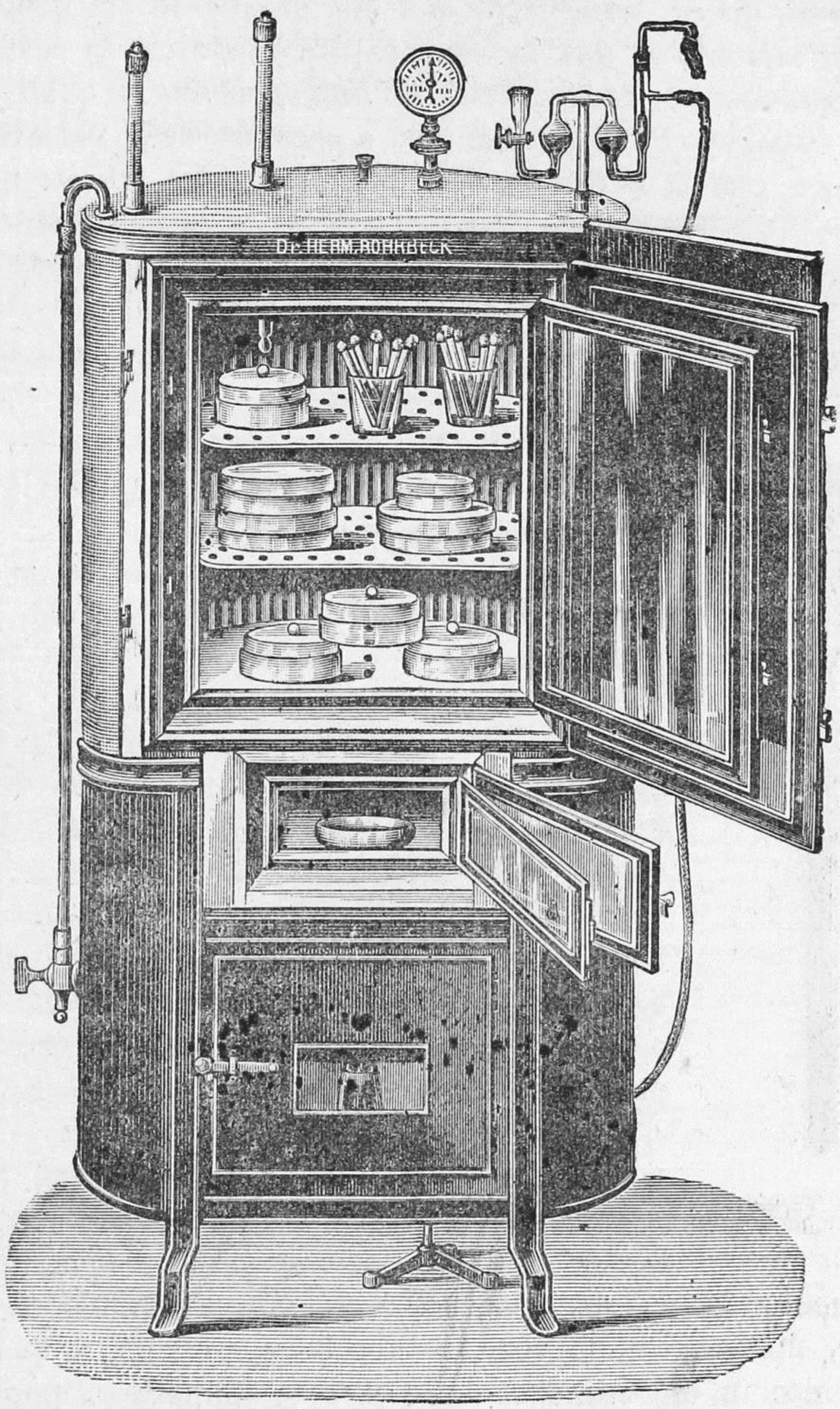


Fig. 17. — Stufa di Rohrbeck.

l'acqua non viene riscaldata dalle fiamme direttamente, ma per via indiretta per mezzo di un mantello di aria calda, e lo spazio interno

(1) Luisen-Strasse, 53.

è pure protetto da uno strato di aria dall'influenza diretta della temperatura dell'acqua (1).

In tutti questi apparecchi, pel riscaldamento dei quali si adopera generalmente il gas, la temperatura è mantenuta costante mediante apparecchi speciali, detti *termoregolatori*, i quali sono destinati a regolare l'afflusso del gas, a seconda delle variazioni della temperatura, che si producono nel bagno d'acqua situato nella doppia parete. Tali variazioni dipendono principalmente dall'incostanza della sorgente calorifica, dovuta alle variazioni nella pressione del gas, e dalle oscillazioni della temperatura dell'ambiente. Per eliminare quest'ultima influenza, si consiglia tenere i termostati in un ambiente, dove la temperatura si mantenga più costante che si può, e per eliminare l'azione delle variazioni di pressione del gas si usano appunto i termoregolatori ed i regolatori della pressione.

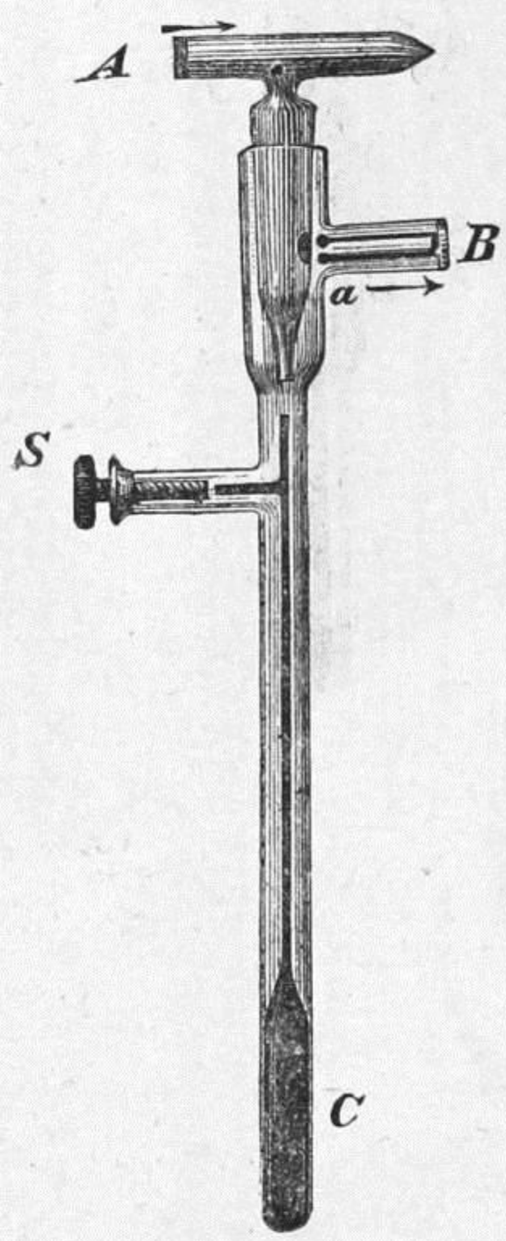


Fig. 18. — Termoregolatore di Reichert.

Il termoregolatore è destinato ad aumentare o diminuire l'afflusso del gas che serve pel riscaldamento della stufa, ogni volta che diminuisce od aumenta la temperatura del bagno d'acqua interparietale, in modo che quella si mantenga possibilmente costante. Di termoregolatori se ne sono costruiti molti modelli, basati alcuni sulla dilatazione dell'aria, altri su quella del mercurio o di liquidi volatili (alcool, etere), altri su quella dei metalli, ed altri finalmente elettrici; ma noi al solito accenneremo soltanto ai pochi che sono generalmente preferiti, sia per bontà che per semplicità e comodità di uso.

Uno dei più comunemente usati è il termoregolatore di Reichert (fig. 18), nel quale l'apertura di afflusso del gas viene regolata per mezzo della dilatazione del mercurio, operata dal riscaldamento. È composto di un recipiente cilindrico C, pieno di mercurio, che si continua con un tubo termometrico, il quale si allarga in alto in un cilindro: in questo si immette a tenuta d'aria

(1) Questi sono i termostati migliori e più usati nei laboratorî. Per chi avesse vaghezza di conoscerne altri, diamo qui l'indicazione bibliografica della descrizione di alcuni modelli, proposti dai relativi autori coll'intenzione di eliminare qualcuno degli inconvenienti che offrono ancora simili apparecchi. — Termostato di Schottelius, descritto nel *Centralblatt f. Bacteriologie*, 1887, Vol. II, p. 97. — Termostato di Babes descritto nel *Centralblatt f. Bacteriologie*, 1888, Vol. IV, p. 19. — Termostato di Lautenschläger, descritto da Abel nel *Centralblatt f. Bacteriologie*, 1889, Vol. V, p. 707.

il tubo A per l'afflusso del gas, fino a che con la sua estremità tocca il principio del tubo termometrico. Il gas che entra dal tubo A va alla lampada passando pel tubo B attaccato al cilindro. Per regolare l'apparecchio avvi lateralmente al tubo termometrico un altro tubo, egualmente pieno di mercurio, chiuso da una vite di ferro S, che si muove facilmente.

Ecco come si adopera. Il tubo d'afflusso A si gira in modo che la sua piccola apertura *a* corrisponda esattamente all'apertura del tubo di efflusso B. La vite S deve essere disposta in modo che, allorquando si è ottenuto quel grado di temperatura che si vuol mantenere costante, il mercurio arrivi precisamente all'estremità superiore del tubo capillare; si spinge allora in su colla vite il mercurio finchè la fiamma comincia appena a diventare piccola, e l'operazione è terminata, giacchè il tubo A viene chiuso dal mercurio, e la fiamma non resta più alimentata che per mezzo del foro *a*. Si può anche variare, corrispondentemente alla temperatura che si desidera, la grandezza della fiamma stessa girando il tubo d'afflusso A, in modo che l'apertura *a* corrisponda più o meno completamente al tubo di efflusso.

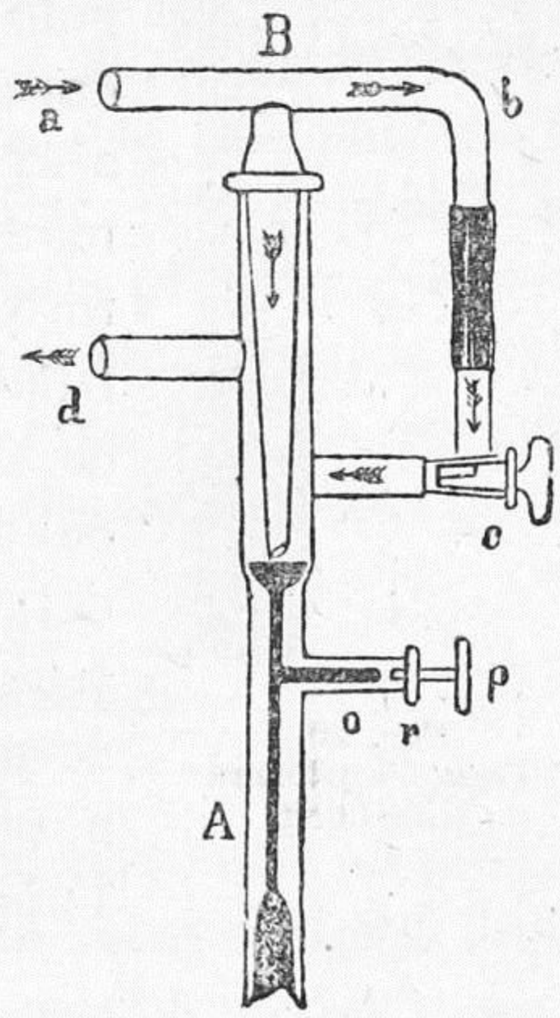


Fig 19. — Termoregolatore Reichert, nuovo modello.

Per rendere più delicata quest'ultima parte dell'operazione, in un nuovo modello di questo termoregolatore (fig. 19) si è aggiunto un rubinetto di vetro laterale (*c*), perforato, il quale girando permette di regolare la grandezza delle fiamme in proporzioni molto più sensibili che col modello precedente.

Dopo qualche tempo che si usa, bisogna avere l'avvertenza di togliere con un pennello dalla superficie del mercurio il deposito polverulento, che vi si forma in causa delle impurità del gas, e che può alterare la sensibilità dell'apparecchio. Le oscillazioni di temperatura che si hanno con questo regolatore sono di circa 0,2° C.

A lato di quello di Reichert va menzionato il termoregolatore di Lothar Meyer, il quale agisce per mezzo della dilatazione di liquidi molto volatili (alcool ed etere), e che modificato alquanto nel suo primitivo modello da Fränkel, da Rohrbeck e da Lautenschläger (1) costituisce uno dei termoregolatori più raccomandabili fra i tanti proposti finora.

(1) V. Catalogo.

Altrettanto buoni sono pure i termoregolatori costrutti da Rohrbeck, dei quali il modello più semplice e meno costoso è rappresentato dalla fig. 20.

Questo si compone essenzialmente da un cilindro di vetro, di cui lo spazio interno è diviso in due metà da un diaframma, il quale nel mezzo è aperto e si approfonda a mo' d'imbuto nella metà inferiore, terminando in punta sottile a poca distanza dal fondo.

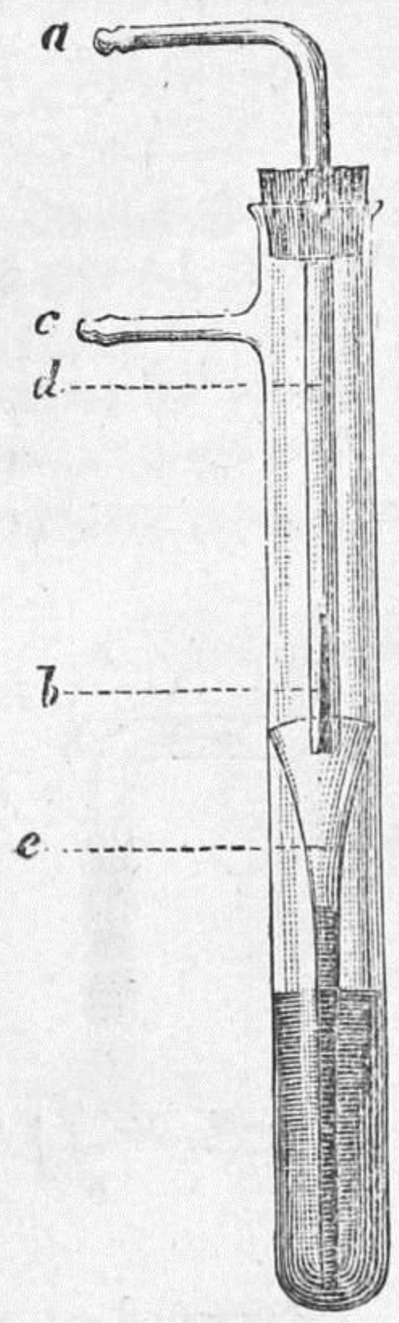


Fig. 20. Termoregolatore Rohrbeck.

Lo spazio inferiore contiene in basso il mercurio e in alto, vicino al diaframma, contiene etere, od una miscela di etere e di alcool. Il gas entra in *a*, attraversa il tubo *b*, la cui estremità inferiore presenta un'apertura a becco di clarinetto, ad angolo molto acuto, ed esce da *c* per andare a riscaldare il termostato. Il tubo di afflusso è munito in alto di un piccolo foro *d*, il quale serve ad alimentare la fiamma anche quando il mercurio chiude tutto il passaggio dell'apertura a becco di clarinetto. Difatti, riscaldando l'apparecchio, il mercurio spinto dai vapori d'etere sale nell'imbuto *e* fino al disopra del diaframma, e chiude in parte l'orificio triangolare del tubo d'afflusso, lasciando a gas un passaggio più o meno stretto, a seconda che sale o che discende. La forma di questo orificio ed i suoi angoli acutissimi assicurano la regolarità di funzione dell'apparecchio.

Per metterlo in azione, lo si riscalda entro un bagno d'acqua, tenendo vicino un termometro esatto, fino alla temperatura che si desidera nel termostato (per lo più 37° C.); a questo punto si spinge in basso il tubo *b* nel tappo di gomma forato, immergendone la punta nel mercurio finchè questo ricopra tutta quanta l'apertura a becco di clarinetto e rimanga aperto soltanto il forellino superiore. L'apparecchio così regolato si pone nel bagno d'acqua interparietale del termostato, in comunicazione colla sorgente del gas e colle fiamme, e si riscalda poscia gradatamente la stufa fino alla temperatura voluta.

Questi sono, come si è detto, i modelli più usati finora. Ve ne sono però anche altri molto sensibili, ma più costosi, nei quali la regolazione si fa per mezzo dell'elettricità, come è quello costrutto da Lautenschläger pel suo termostato speciale (1), e l'altro di Babes (2). Rinunciamo alla descrizione di questi come di altri ter-

(1) Abel, *Ein neuer Thermostat und Thermoregulator, ecc. nach Lauenschläger*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. 5, 1889, pag. 707.
(2) Babes, *Ueber einige Apparate zur Bacterienuntersuchung*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. 4, 1888, pag. 19.

moregolatori basati sulla dilatazione dei corpi solidi, recentemente proposti da Miquel (1) e da Roux (2), e rimandiamo invece gli studiosi alle relative pubblicazioni.

Prima di lasciare quest'argomento, ricordiamo ancora che per avere nei termostati una temperatura sicuramente costante, specialmente là dove esiste una notevole differenza fra la pressione diurna e quella notturna del gas, il termoregolatore spesso non è sufficiente, ma è necessario ancora interporre fra questo e la conduttura del gas un *regolatore della pressione*. Anche di tali apparecchi ne esistono molti; menzioniamo soltanto, fra i migliori, quello di Mottessier e quello di Tursini (fabbricato da Zambelli), i quali possono servire per una o per più stufe, interponendoli fra la sorgente del gas e la diramazione che si distribuisce alle singole stufe.

Adoperando oltre il termoregolatore anche il regolatore della pressione, si ha pure il vantaggio di evitare il pericolo dell'estinzione delle fiamme e di una successiva fuga di gas, che può avvenire per oscillazioni brusche della pressione. Per ovviare a tale inconveniente, là dove non si ha un regolatore della pressione, Koch ha ideato e fatto costrurre una speciale lampada di sicurezza, la quale quando si spegne chiude automaticamente l'apertura d'escita del gas, e che si applica ai termostati in luogo delle lampade ordinarie.

5. Piccoli strumenti ed oggetti diversi.

Oltre agli apparecchi finora descritti, havvi una serie di piccoli strumenti e di oggetti diversi, che si adoperano comunemente nella pratica manuale delle ricerche batteriologiche, e che in parte sono comuni alle ordinarie manipolazioni d'istologia, come ad es. gli aghi, le spatole, le forbici, le pinzette, i vetri da orologio, le capsule di vetro o di porcellana, e così via.

Sonvene però molti altri, i quali servono specialmente per le ricerche batteriologiche, e fra questi nominiamo anzitutto i così detti *aghi di platino*, che non sono altro che fili di platino non molto grossi, diritti o ricurvi ad ansa, lunghi 60-70 mm., infissi nell'estremità di una bacchetta di vetro, i quali servono per raccogliere piccole quantità di cultura o di altro materiale per fare innesti e preparati microscopici.

(1) Miquel, *Sur un noureau thermoregulateur*, Annales de Micrographie, T. I, N. 3, pag. 119. *Nouveaux regulateurs, bases sur la dilatation des métaux solides*, Annales de Micrographie, Tome II, N. 3, pag. 150 e N. 5 pag. 241.

(2) Roux, *Sur un règulateur de temperature applicable aux étuves*, Annales de l'Institut Pasteur, N. 3. 1891, pag. 158.

Anche le siringhe da iniezione (di Pravaz, di Koch, di Tursini, ecc.) sono piccoli strumenti che servono per le esperienze negli animali, ma queste verranno descritte nel capitolo speciale della tecnica sperimentale.

Altri piccoli apparecchi che si adoperano per le culture, quando se ne vuol seguire lo sviluppo coll'aiuto del microscopio, sono le così dette *camere umide da coltivazione*. Di queste se ne sono costrutte in gran numero e con varî sistemi. Hoffmann ne ha ideato l'applicazione la prima volta nel 1857, praticando una finestra quadrata in un pezzo di cartone disinfettato, ed applicandolo, dopo averlo bagnato d'acqua distillata, sul vetro portoggetti. Su questa finestra applicava poi un coproggetti, portante sulla sua superficie inferiore una goccia di liquido nutritivo coi germi da coltivare. In seguito questo apparecchio semplicissimo fu modificato da Hilgendorf e da Hallier, che ne costrussero uno adatto a permettere il rinnovamento dell'aria. Altri consimili furono poi proposti da De Bary, da Rindfleisch, da Recklinghausen, da Griffini e da altri, i quali tutti si studiarono di far sì che nei loro apparecchi fosse possibile l'esistenza delle principali condizioni di vita dei microrganismi (umidità, presenza dell'aria e un certo grado di temperatura), senza permettere in pari tempo l'ingresso di germi stranieri. Oggidì si usano d'ordinario per tale scopo le *camere* di Ranvier e di Nachet, oppure nel maggior numero dei casi semplicemente i *portoggetti incavati*, su cui si adatta il coproggetti con una goccia della sostanza di nutrizione che contiene i germi da osservare, chiuso all'intorno con vaselina o con altre sostanze oleose.

L' osservazione microscopica dei microrganismi viventi nelle *goccie sospese* entro l'incavo dei portoggetti serve bene per studiarne il movimento ed altri fenomeni biologici.

Per seguire coll'osservazione microscopica le fasi di sviluppo dei batterî, specialmente per quelli che hanno bisogno di una temperatura superiore a quella dell' ambiente, si adoperano i *tavoli riscaldanti*, per mezzo dei quali i microrganismi contenuti nella camera umida si mantengono a quel grado di temperatura costante che si desidera. Di tali apparecchi quello di Israel costruito da Rohrbeck, e quello di Vignal costruito da Wiesnegg, il quale è pure munito di termogolatore, sono specialmente da raccomandarsi per semplicità e comodità di uso.

Per fare l'osservazione continuata delle culture, si usa anche tenere tutto quanto il microscopio entro un termostato quadrangolare, appositamente costrutto e munito di termoregolatore.

Oltre a ciò vi è un gran numero di oggetti di vetro, che servono per le culture. Tali oggetti devono avere alcuni requisiti speciali, e cioè di essere facilmente sterilizzabili, di potersi aprire per farvi l'innesto dei batterî da coltivare senza soverchio pericolo per l'introduzione di germi estranei, e finalmente di essere chiusi in modo, che sia permesso l'ingresso dell'aria e non quello dei germi che essa contiene. A quest' ultima condizione corrisponde appunto la chiusura con turaccioli d' ovatta, la quale serve da filtro pei germi dell'aria.

I recipienti più usati per le culture sono i tubi da saggio, le boccette coniche, o di altra forma speciale, chiuse con ovatta, e le scatole doppie di vetro.

I *tubi da saggio* sono così generalmente noti, che non fa bisogno di descriverli.

Quanto ai recipienti in forma di boccetta, oltre le *boccette coniche* di Erlenmeyer, le quali servono specialmente per contenere e sterilizzare le sostanze nutritive prima di farne la distribuzione, i modelli migliori per le culture sono quelli dei così detti palloncini di Pasteur e boccette di Miquel (fig. 20), i quali hanno sui tubi da saggio il vantaggio di aver l'apertura per fare l' innesto più stretta del recipiente, e di averla protetta dalla polvere per mezzo del cappuccio di vetro smerigliato, il quale termina in un tubo sottile chiuso con ovatta.

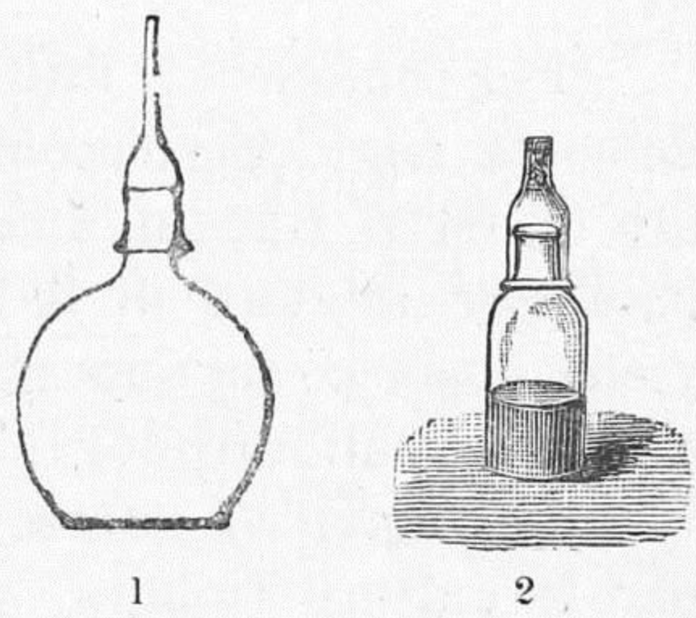


Fig. 21. — Palloncino per cultura di Pasteur, e boccetta di Miquel.

La forma 1 della fig. 21 serve specialmente per le culture nei liquidi, mentre il modello 2, avendo un diametro press' a poco corrispondente a quello dei tubi da saggio, può, come questi, servire per le culture nei mezzi solidi, gelatina e agar.

Le *scatole di vetro* che si adoperano per le culture hanno forma e dimensioni diverse, secondo lo scopo per cui devono servire. Le scatole di Petri (fig. 22, n. 1) sono piatte, con coperchio semplice, non smerigliato, e misurano in generale 10-12 cent. di diametro, dovendo servire per le culture isolanti. Quelle di Soyka invece (fig. 22, n. 2), sono più piccole e a coperchio smerigliato, giacchè servono specialmente per conservare le culture per le collezioni batteriologiche.

Le scatole di vetro hanno sugli altri recipienti il vantaggio che il loro contenuto è più facilmente accessibile, specialmente all'esame

microscopico: hanno però l'inconveniente di essere meno protette dall'ingresso dei germi estranei.

Le *campane doppie* di vetro, che sono una specie di grandi cristallizzatori, servono come camere umide, allorquando il loro fondo è coperto di carta bibula bagnata, per contenere le culture che si fanno sulle patate, sui portoggetti, o sulle lastre di vetro. Queste ultime si dispongono entro le campane, l'una sopra l'altra, mediante le *banchette* di vetro, o di zinco, quadrangolari (fig. 23).

Si è parlato qui di tali oggetti, perchè sono di un uso, dirò così, generale; ma trattando dei metodi speciali di cultura, aerobica ed anaerobica, e dei metodi di ricerca batteriologica dell'aria e dell'acqua, si parlerà pure di altre forme di recipienti, adatti appunto per gli scopi speciali a cui devono servire.

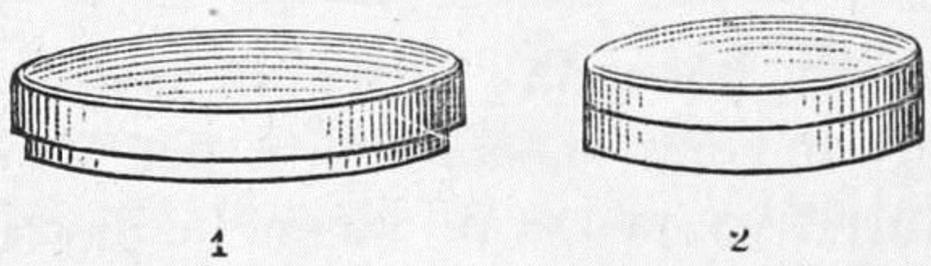


Fig. 22. — Scatole di Petri e di Soyka.

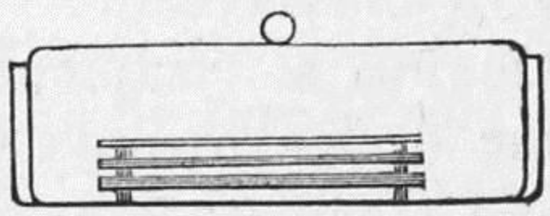


Fig. 23. — Campana doppia con lastre di vetro sulle banchette.

Per contenere i tubi da cultura, e per poterli trasportare comodamente negli apparecchi di sterilizzazione, si usano le *cestine* di filo di ferro zincato, una delle quali si vede disegnata nell'apparecchio sterilizzatore di Koch ad aria calda. Il fondo di tali cestine viene coperto da uno strato d'ovatta, per impedire che i tubi si rompano nell'introdurveli.

Le *lastre di vetro*, sulle quali si distende la gelatina e l'agar per le culture isolanti, si sterilizzano a 150° entro una *scatola di lamiera di ferro*, appositamente costrutta.

Ricordiamo infine che è bene avere anche una cassetta speciale di lamiera di ferro, per contenere gli strumenti che servono per le necroscopie degli animali e che devono sempre venire sterilizzati prima di adoperarli.

6. Sterilizzazione.

Quest'operazione dev'essere eseguita su tutti gli oggetti ed istrumenti che si adoperano per le ricerche batteriologiche, e deve farsi accurata quanto mai, poichè costituisce uno dei capisaldi fondamentali per la buona riuscita di quelle: e siccome non è possibile esporre tutti quanti i particolari minuti di tali operazioni, i quali si apprendono soltanto colla pratica diuturna, così non si può mai raccomandare abbastanza di attenersi col maggior rigore possibile alle norme generali che si andranno ora esponendo.

Le ricerche batteriologiche infatti non offrono in sè alcuna seria difficoltà, ma sono tuttavia assai delicate e richiedono un'osservanza scrupolosa di un mondo di particolari, la cui pratica non si apprende se non dopo una diligente osservazione ed un lungo esercizio.

Basti per ciò rammentare che, mentre si va alla ricerca di una data specie di microrganismi, noi siamo per ogni dove circondati da un'infinità di altre specie affini. Ve ne sono in grandissimo numero sospesi nell'aria, ve ne sono aderenti alle nostre mani e ai nostri vestiarì, in una parola, dappertutto, e se non si può essere assolutamente sicuri che non ne siano inquinati gli oggetti di che ci serviamo, non si può neanche riposare tranquilli sull'esattezza dei risultati che si ottengono.

È noto che le forme semplicemente vegetative di questi esseri non hanno un grande potere di resistenza agli agenti esterni, fisici e chimici, ma che invece le spore sono assai resistenti; ed è assai ristretto il numero delle sostanze chimiche che meritano realmente l'appellativo di disinfettanti, inteso nel senso che vuole oggi la scienza, che cioè sieno atte non solo a sospendere, ma anche a distruggere la vita di qualsiasi forma di microrganismi. Non dee adunque far meraviglia se vengono proposti per la *sterilizzazione* degli oggetti e degli strumenti gradi di temperatura assai elevati e soluzioni chimiche concentrate, e se tuttavia, malgrado ciò, le culture vanno non di rado perdute, per lo inquinamento di germi rimasti aderenti agli oggetti che le contengono, più spesso che non pei germi introdotti coll'aria.

Per isterilizzare gli oggetti e gli strumenti che servono a scopo batteriologico, si usa di preferenza il calore, secco od umido, unitamente anche ai disinfettanti chimici. Di questi i più comunemente usati sono: gli acidi minerali concentrati, le soluzioni alcaline riscaldate di soda e di potassa, e il lisolo.

Per ottenere la sterilizzazione dei tubi da saggio e di tutti gli altri oggetti di vetro, che si adoperano per le culture, o per altre operazioni batteriologiche, si usano le regole seguenti. Si comincia anzitutto a fare una specie di sterilizzazione meccanica, cercando di pulire meccanicamente i singoli oggetti più che si può; e ciò, sia per facilitare il còmpito della temperatura elevata a cui più tardi si espongono, sia per evitare che, se vi sono residui di sostanze organiche aderenti al vetro negli oggetti già adoperati, questi residui, carbonizzandosi per opera del riscaldamento, lascino sporchi i recipienti. A tal uopo gli oggetti già usati, e specialmente quelli per le culture, si fanno bollire a lungo in una soluzione di soda o di potassa, e si lavano poscia con acqua comune abbondantemente, servendosi anche, quando lo permette la forma del recipiente, di spazzole specialmente adatte per quest'uso. Dopo di ciò, o si lasciano semplicemente disseccare all'aria, capovolgendoli, o meglio si sciacquano prima con acqua distillata, e poscia con alcool e con etere, che si lascia evaporare.

Spesso è anche necessario, specialmente per togliere il grasso

dal vetro, oppure per distaccare le sostanze organiche essiccate, quando colla spazzola non si riesce, lavare gli oggetti cogli acidi minerali concentrati (cloridrico, solforico), e sciacquare poscia con acqua, fino a portar via qualsiasi traccia di acido. Dopo averli fatti disseccare, se si tratta di tubi da saggio e di boccette, si chiudono con ovatta *ben digrassata e non idrofila,* badando a che il turacciolo sia compatto, si adatti un po' forzatamente, ma non troppo, all'orifizio del recipiente, e nei tubi da saggio penetri per la lunghezza di circa 2 cm., sporgendo anche alquanto al di fuori, per poterlo estrarre comodamente. Le scatole di vetro si involgono con carta bibula ordinaria, per poterle conservare sterili anche dopo il riscaldamento.

Fatto ciò, si sottopongono nell'apparecchio sterilizzatore ad aria secca ad una temperatura di 150° C., per mezz'ora ad un'ora, a seconda dei casi, calcolando sempre il tempo dal momento che nell'interno dell'apparecchio la temperatura ha raggiunto il grado predetto. I tubi da saggio si mettono entro le cestine di filo di ferro, le lastre di vetro entro la cassetta metallica speciale, le pipette di vetro anch'esse entro un apposito recipiente cilindrico, di metallo, che serve a preservarle dalla polvere dopo averle sterilizzate. Bisogna badare a che il cotone dei turaccioli non sia a contatto delle pareti dell'apparecchio, per evitare che si bruci. Il cotone si può ritenere sicuramente sterilizzato, allorquando ha acquistato un colorito leggermente brunastro.

Si consiglia da alcuni, per risparmio di tempo e di spesa, di limitare le operazioni di sterilizzazione dei tubi da saggio al solo lavamento e pulitura meccanica; giacchè i tubi devono poscia, allorquando contengono i mezzi di cultura, esser sottoposti più volte all'azione del vapor d'acqua a 100° C. Soltanto i tubi destinati pel siero di sangue dovrebbero essere sempre sterilizzati completamente, perchè questa sostanza non può essere riscaldata fino a 100° C. senza alterarsi.

Per mio conto non posso consigliare una simile pratica, giacchè non si è mai abbastanza al sicuro contro l'inquinamento delle culture, e per quanto le pratiche di disinfezione degli oggetti e delle sostanze nutritive costino tempo e fatica, si è poi largamente ricompensati dalla maggiore esattezza e sicurezza delle operazioni batteriologiche. Ho anche visto che, facendo in quel modo, avvi sempre un certo numero di tubi che restano inquinati e che non possono quindi venire utilizzati per le culture.

La disinfezione dell'ago di platino che serve per gl'innesti, come quella dei coltelli, forbici, pinze e di tutti gli strumenti che servono per la pratica degli innesti, o per le necroscopie degli animali inoculati, si compie in generale arroventandoli sulla fiamma del gas o dell'alcool *ad ogni singola volta,* e lasciandoli poscia raffred-

dare, proteggendoli dalla polvere mediante una campana. A questo riguardo giova ricordare un piccolo particolare pratico, assai utile per risparmiare, per quanto si può, gli strumenti. Il grado di arroventamento sufficiente pel nostro scopo si raggiunge anche prima del calore rosso, ossia allorquando l'oggetto riscaldato, posto a 2-3 cm. di distanza dal viso, lascia sentire distintamente il calore radiante. Questi strumenti però si possono sterilizzare anche meglio tutti insieme in un grosso recipiente di vetro chiuso con ovatta, oppure dentro una scatola di lamiera di ferro, dove si mantengono disinfettati fino al momento che si vogliono adoperare.

Quando si tratta di ricerche da farsi fuori del laboratorio, o quando non si ha l' apparecchio per sterilizzare nell' aria secca a 150°, allora si deve naturalmente supplire col riscaldamento diretto sulla fiamma del gas o di una lampada a spirito. Quest'ultima è da preferirsi, perchè la fiamma del gas riscalda troppo e troppo rapidamente, producendo sovente la rottura degli oggetti di vetro.

Per isterilizzare in tal guisa i tubi da saggio, dopo averli lavati e fatti disseccare accuratamente (devono essere bene asciutti per evitare che si rompano nel riscaldarli sulla fiamma), si chiudono coll'ovatta e si spinge il turacciolo, colle punte d'una pinzetta precedentemente arroventate, bene addentro nel tubo; si fanno riscaldare sulla fiamma, fortemente e per un certo tempo, anzitutto i due terzi inferiori, si lascia raffreddare finchè si può tenere colla mano, e si ripete quindi la stessa operazione nel terzo superiore del tubo: qui bisogna badare specialmente a sterilizzare bene l'ovatta, del che si è sicuri quando questa ha assunto un colore bruniccio. A tal punto colle stesse pinze arroventate si tira fuori il turacciolo di cotone, tanto che si possa poi all'occorrenza trar fuori liberamente anche colle dita.

La disinfezione delle lastre di vetro, precedentemente lavate e disseccate, si ottiene facendo riscaldare fortemente sulla fiamma una delle due superfici della lastra, e poggiandola poscia colla superficie riscaldata rivolta all'insù sopra un apposito banchetto di vetro, situato in posizione orizzontale sull'apparecchio livellatore; si copre subito con una campana, e si lascia raffreddare finchè sia pronta a ricevere la gelatina o l'agar per le culture.

Il processo di sterilizzazione sulla fiamma ad alcool delle pipette e delle piccole capsule di vetro è inutile descriverlo. Soltanto a riguardo delle pipette è da notare che è utile chiuderne l'estremità superiore con un piumacciolo d'ovatta, il quale impedisce l'ingresso ai germi dell'aria, e permette di aspirare i liquidi egualmente.

Le siringhe di Pravaz colle guarniture d'amianto, dopo averle

accuratamente lavate colla soluzione d'acido fenico, si possono anche sterilizzare riempiendole con acqua distillata, e riscaldando direttamente sulla fiamma il cilindro della siringa stessa munita dell'ago, il quale resta anch'esso disinfettato dal vapore acqueo che ne fuoriesce. Si può ripetere l'operazione tre o quattro volte, per essere sicuri di avere ottenuto l'intento. Appena dopo sterilizzate, si chiudono entro un recipiente di vetro parimente disinfettato, e quivi si conservano.

Si annette con ragione una grande importanza anche alla pulitura esatta dei vetrini portoggetti e coproggetti che hanno già servito per far preparati; e ciò per evitare che, restando aderente al vetrino qualche resto della preparazione, possa questo divenir causa d'errore, nelle successive ricerche per cui i vetrini stessi vengono adoperati. A tal uopo, ed anche per isterilizzare in pari tempo il materiale infettante che non resta ucciso nel fare il preparato, si suole tenere immersi i vetri nell'acido solforico concentrato per un certo tempo, lavarli poscia con acqua e con alcool ed asciugarli infine con un pannilino ben netto.

Un altro metodo, che ho trovato anche per mia esperienza assai confaciente allo scopo, è quello descritto da Knauer (1), e che consiste nel gettare i portoggetti e coproggetti usati in un recipiente di metallo, o di terra, smaltato, contenente $^1/_2$ litro di soluzione di lisolo al 10 %, nel tenere questo per mezz'ora a 100° C. nella sterilizzatrice a vapore di Koch, e nel fare poscia arrivare un forte getto d'acqua entro la soluzione di lisolo ancora calda, fino a che l'acqua ne fuoriesce ben chiara. I vetrini, asciugati con un pannolino pulito, appaiono come fossero nuovi, anche se la preparazione che vi era aderente era fatta da un pezzo.

(1) Knauer, *Eine bewährte Methode zur Reinigung gebrauchter Objektträger und Deckgläschen*, Centralblatt f. Bacteriologie. Vol, X, 1891, pag. 8.

CAPITOLO III.

Sostanze coloranti e metodi di colorazione.

Altrettanto importante che l'uso dell'immersione omogenea e dell'apparecchio di illuminazione, fu per la ricerca dei microparassiti l'introduzione dei colori d'anilina, fatta specialmente per opera di Weigert e di Ehrlich, e migliorata poscia notevolmente da Koch e da altri.

In principio si era da Recklinghausen posta a profitto la proprietà che hanno i microbi di resistere all'azione degli acidi e degli alcali, più che gli elementi organici dei tessuti; cosicchè, sottoponendo all'azione di tali reagenti un tessuto che contiene microrganismi, questi conservano la loro apparenza inalterata, mentre i tessuti rimangono disciolti o rigonfiati, e scompaiono più o meno all'occhio dell'osservatore.

Un tal metodo di ricerca può infatti servire a dare la certezza della presenza dei microbi, quando questi hanno un certo volume, o quando si trovano in gran numero e riuniti sotto forma di zooglee. Appena però si trovano isolati o commisti ad una grande quantità di detritus granulari, come anche quando sono molto sottili, un tal mezzo non è più sufficiente; sia perchè vi sono nei tessuti alcune specie di granulazioni che resistono all'azione di quei reagenti altrettanto che i microbi, come anche perchè alcuni di questi, piccoli e delicati, si alterano per l'azione degli alcali e degli acidi, come i tessuti.

Il metodo della colorazione è adunque indispensabile per siffatti studì, e per quanto sia basato su dati empirici, ci è tuttavia di un grandissimo aiuto; tanto che la scoperta di alcuni microparassiti, di quello della tubercolosi ad es., è dovuta specialmente all'essersi trovato empiricamente il modo speciale di comportarsi di quelli verso le sostanze coloranti.

1. Generalità.

Premettiamo alcune cose generali sulla colorazione, a mo' di introduzione, prima di esporre i particolari relativi al modo di trattare i liquidi e i tessuti dell'organismo animale, in cui si devono ricercare i microrganismi.

I fenomeni che avvengono nell'atto della colorazione sono in parte semplicemente fisici, dovuti cioè ad imbibizione e ad infiltrazione degli elementi, ma per la massima parte sono fenomeni microchimici, dei quali ignoriamo perfettamente la natura; ond'è che, per esprimere il diverso modo di agire delle sostanze coloranti, dobbiamo per ora accontentarci di dire con Ehrlich, empiricamente, che alcune di tali sostanze hanno la proprietà di tingere i tessuti uniformemente in tutte le loro parti, ed altre invece posseggono un'azione così detta *elettiva*, hanno, cioè, la proprietà di fissarsi in alcuni elementi e di lasciare gli altri incolori, in tutto od in parte. Più esattamente però deve dirsi che l'azione elettiva della maggior parte di queste ultime sostanze non è immediata, giacchè a prima giunta la colorazione è diffusa, ma si può facilmente localizzare a certi elementi, mediante un trattamento successivo abbastanza semplice; e questo consiste nel porre il tessuto colorato in contatto con sostanze che hanno colla materia colorante un'affinità maggiore che certi elementi e minore invece che altri, i quali soltanto perciò ritengono la primitiva colorazione.

Il linguaggio con cui si è dovuto spiegare la cosa non è punto scientifico, ma è necessario mantenerlo, finchè la ragione dei fatt suesposti sfugge alle nostre investigazioni.

Abbiamo adunque due specie di colorazione, e corrispondentemente due gruppi di sostanze coloranti: le prime, aventi un'azione prevalentemente *diffusa*, nelle quali il principio colorante è un acido, e le altre invece, aventi la tendenza di rimanere localizzate soltanto al nucleo cellulare, nelle quali la sostanza veramente colorante è una base: donde il nome di sostanze basiche, dato a queste ultime sostanze, e quello di *colorazione nucleare*, dato alla colorazione da esse operata.

Orbene nella ricerca dei microrganismi si adopera quasi esclusivamente quest'ultima specie di colorazione, senza che però si possa dare alcuna regola generale, nè per la scelta delle materie coloranti, nè pel modo di colorazione: si può dire soltanto che ciascuna specie di microrganismi predilige specialmente questa o quella sostanza colorante, questo o quel processo di colorazione. Una sola differenza generale, segnalata da Weigert, esiste fra i micrococchi ed i bacilli; i primi si colorano con tutte le sostanze che servono per la colorazione nucleare, mentre pei bacilli si usano soltanto i colori di anilina.

Un'altra proprietà interessante delle materie coloranti, oltre l'azione elettiva, è il così detto *potere di colorazione*, ossia la resistenza che offrono, una volta fissate negli elementi dei tessuti, ad

essere portate via dai reattivi decoloranti (alcool, acidi diluiti), resistenza che è di vario grado per le singole sostanze coloranti.

2. Sostanze coloranti.

a) Jodio.

Lo jodio è fra le prime sostanze che sono state adoperate per la colorazione dei microparassiti, ed è stato Billroth che l'ha introdotto per primo nella tecnica di queste preparazioni. Oggidì, però, che si conoscono tante altre sostanze migliori, questa non si adopera quasi più come mezzo colorante: lo jodio ha ricevuto invece un'applicazione importante, come fissativo, in un metodo speciale di colorazione, che è il metodo di Gram, sotto forma di soluzione jodo-jodurata, composta da:

Iodio	1
Ioduro potassico	2
Acqua.	300

Nothnagel si è servito con vantaggio dello jodio per lo studio dei microrganismi delle feci, usando la soluzione seguente di Lugol:

Jodio	1,20
Joduro di potassio	1,80
Acqua	30,0

Friedländer dà quest'altra formula:

Jodio	1,0
Joduro di potassio	2,0
Acqua	50,0

Queste soluzioni si allungano poscia con acqua quanto si vuole. In generale i cocchi e di bacilli assumono per opera dello jodio un colorito giallo-brunastro. È da avvertire però che lo jodio forma sempre composti chimici facilmente scindibili, epperò anche la colorazione dei microbi presto svanisce. I preparati che se ne ottengono sono perciò difficili a conservarsi e non si possono chiudere nel balsamo del Canadà, nè tampoco in glicerina: il mezzo che pare li mantenga più a lungo è una soluzione concentrata di gomma.

b) Ematossilina.

L'ematossilina, principio colorante estratto dal legno di campeggio, è già molto migliore dello jodio, ed è stata la prima volta usata da Eberth e da Wagner, e poscia da Weigert per la ricerca dei microbi. Si trova in commercio sotto forma di cristalli rosso-bruni, per lo più impuri; di questi si fa una soluzione satura nell'alcool assoluto, che si mescola poscia ad altri liquidi per comporre la soluzione colorante.

Per preparare le soluzioni di ematossilina si sono proposte parecchie formule. La più antica è quella di Böhmer così composta. Si fa una prima soluzione di gr. 0,35 di ematossilina in 10 gr. di alcool assoluto, un' altra di 1 gr. di allume in 30 di acqua distillata, e si aggiungono a quest'ultima alcune goccie della prima, finchè si ottiene una bella colorazione violetta.

Friedländer (1) dà la formula seguente:

Ematossilina	2,0
Alcool	100,0
Acqua distillata	100,0
Glicerina	100,0
Allume	2,0

Bizzozero adopera la seguente soluzione. Si fanno a parte due soluzioni, una di gr. 0,50 di ematossilina cristallizzata in gr. 6 di alcool, a cui si aggiungono 75 cc. di acqua distillata, ed un'altra di gr. 2 di allume in 75 di acqua. Si mescolano, lentamente ed agitando, le due soluzioni e si lascia la miscela esposta all'aria per alcuni giorni, finchè ha preso un bel colore azzurro. Vi si aggiunge allora l' acqua perduta coll'evaporazione e 30 gr. di glicerina. Si filtra, e si conserva in vaso non perfettamente chiuso.

Se non si ha l'ematossilina, si scioglie nell'alcool l'estratto di legno di campeggio, che si trova facilmente in commercio, oppure si raschia il legno e si aggiunge alla raschiatura tanto etere quanto basta per coprirla, lasciandolo così finchè ne ha estratto il colore: si decanta allora il liquido, e vi si aggiunge, a goccia a goccia, una soluzione acquosa di allume, finchè si è ottenuto un colore violetto scuro.

Le soluzioni di ematossilina, comunque preparate, non servono se non otto giorni almeno dopo la loro preparazione, giacchè in principio producono una colorazione rossastra e diffusa. A mano a mano però il colorito si fa violetto ed il liquido acquista la proprietà elettiva, di fissarsi cioè sui soli nuclei e sui microrganismi. Questa trasformazione delle proprietà coloranti si può accelerare, aggiungendo al liquido una piccolissima quantità di ammoniaca, tanto piccola che basta persino esporlo per breve tempo ai vapori d'ammoniaca ed agitare; serve meglio però l'aggiunta d'una goccia di una soluzione di carbonato d'ammonio.

L'uso di questa sostanza ha molti inconvenienti. Anzitutto si conserva assai difficilmente, si ossida e precipita; sicchè si deve sempre filtrare la soluzione prima di usarla, per quanto le soluzioni ove entra la glicerina si conservino meglio ed ammuffiscano più difficilmente. Inoltre soltanto le forme di cocco, e neanche tutte si colorano coll'ematossilina, mentre le forme di bacillo non hanno alcuna affinità con questa sostanza. Si colorano bene invece coll'ematossilina le zooglee.

Nella glicerina la colorazione ematossilinica a poco a poco svanisce, mentre si conserva bene nel balsamo del Canadà, purchè si adoperi come mezzo rischiarante il xilolo, oppure l'olio di legno di cedro, e non l'olio di garofani che ossida la materia colorante.

(1) Friedlaender, *Microscopische Technik*, 2 Aufl. 1884.

L'ematossilina serve, combinata coi colori rossi di anilina, a dare una colorazione doppia dei nuclei in violetto e dei microbi in rosso. Se poi alla soluzione di ematossilina si aggiunga l'eosina, in proporzione di 0,5 %, si può avere anche una colorazione tripla, come col picrocarmino, giacchè l'eosina tinge in roseo il protoplasma cellulare.

c) Carmino.

Neppure il carmino ha nella tecnica micologica un uso molto esteso, ma è necessario farne menzione, perchè esso serve per la colorazione doppia. Questa è basata sul fatto trovato da Weigert, che il carmino, mentre ha poca affinità pei microrganismi, ne ha invece una maggiore pei nuclei cellulari che non i colori d'anilina, tanto che è capace di sostituire nei nuclei la colorazione prodotta da queste ultime sostanze. In tal modo, facendo agire prima sui preparati i colori d'anilina e poscia il carmino, si possono avere i nuclei colorati in rosso ed i microbi in violetto (violetto di genziana o di metile).

Le soluzioni coloranti di carmino si possono preparare in molti modi; avvi la soluzione neutra, alcalina ed acida, avvi la soluzione di carmino e allume, e così via. Il preparato però che serve meglio di tutti per la colorazione doppia, *quando è buono*, è il *picrocarmino*. Dico così, perchè non è facile ottenere un picrocarmino che dia una colorazione conveniente e sicura; mentre, se è ben preparato, ha pel nostro scopo il duplice vantaggio di contenere già in sè due sostanze coloranti, di impartire cioè ai nuclei un colorito rosso vivace ed al protoplasma cellulare un colorito giallo verdastro, e di conservarsi bene anche nella glicerina.

Weigert (1) ha prescritto un metodo per preparare facilmente un buon picrocarmino, capace di colorare i preparati in 5-10 minuti, senza il pericolo di una colorazione eccessiva, anche se vi si tengono immersi per un tempo maggiore. Il suo processo avrebbe pure il vantaggio di poter trasformare un cattivo picrocarmino in un composto colorante buonissimo, e ciò semplicemente combinando il picrocarmino col carmino acido. Secondo Weigert, si prendono 2 gr. di carmino e si sciolgono in 4 gr. di ammoniaca; si lascia stare la soluzione per 24 ore, impedendone la evaporazione, e vi si aggiungono 200 gr. di soluzione satura di acido picrico. Si lascia di nuovo a sè il miscuglio per altre 24 ore, e vi si aggiunge a goccia a goccia l'acido acetico, cautamente, fino a che si vede comparire la prima traccia d'un precipitato, che non scompare più coll'agitare del liquido. Si lascia

(1) Weigert, *Zur Technik der mikroskopischen Bacterienuntersuchungen*. Virchow's Archiv, Bd. 84 (1881), p. 275.

stare 24 ore e si filtra. Ciò malgrado, però, non si riesce ad ottenere un liquido limpido, ed occorre sempre filtrare prima di adoperarlo: si può renderlo limpido aggiungendo una goccia d'ammoniaca, e dopo un giorno, se la soluzione non è ancora perfettamente trasparente, se ne aggiunge ancora un'altra, e così di seguito finchè si ottiene, 24 ore dopo aggiunto quel po' d'ammoniaca, un liquido limpidissimo. Quest'aggiunta non altera menomamente le proprietà coloranti del picrocarmino, ed ha il vantaggio di evitare la filtrazione ogni volta che si adopera. Se la colorazione che se ne ottiene è troppo gialla, si aggiunge un po' d'acido acetico, se è troppo rossa e diffusa si aggiunge un po' d'ammoniaca; se poi si ha un picrocarmino che non colora bene, si aggiunge un po' d'acido acetico e si ottiene così una buona sostanza colorante. Per quanto questo processo finisca col dare buoni risultati, è però, come si vede, assai lungo e noioso, perchè non si riesce che a furia di prove, che si devono ripetere alla distanza di un giorno l'una dall'altra.

Bizzozero (1) invece ha trovato un metodo di preparazione del picrocarmino, che è altrettanto semplice quanto di riuscita sicura. Si sciolgono in un mortaio gr. 0,50 di carmino puro in 4 cc. di ammoniaca forte e 50 di acqua distillata; in un altro mortaio si prepara un'altra soluzione di gr. 0,50 di acido picrico in 50 gr. d'acqua riscaldata. Si versa la soluzione picrica, lentamente e rimescolando sempre, nella prima soluzione e si fa poscia evaporare a bagno maria, finchè non si avverte più che un odore debolissimo d'ammoniaca. In generale a questo punto il liquido è ridotto alla metà circa del suo volume primitivo (50 cc.); si lascia raffreddare e vi si aggiunge immediatamente $^1/_5$ del volume (10 cc.) di alcool assoluto. Si filtra e si conserva in bottiglia ermeticamente chiusa. *Non è necessario filtrare prima di adoperarlo.*

Un'altra buona soluzione è quella di *carmino* e *allume*, che si prepara sciogliendo in un mortaio gr. 1,5 di carmino e gr. 6 di allume in 200 di acqua distillata, e facendo bollire per 20 minuti; si lascia raffreddare e si filtra.

d) **Colori d'anilina.**

Questo è senza dubbio il gruppo di sostanze che rende i maggiori servizî per la colorazione dei microbi, e la loro applicazione si deve specialmente agli studi di Weigert, di Ehrlich e di Koch, il quale, combinando l'uso dei colori d'anilina col processo di fissazione sui vetrini coprogetti, operata dall'essiccamento e dal calore, ha creato un metodo speciale, che va appunto col nome di « metodo di Koch ».

L'azione di queste sostanze non è elettiva nel vero senso della parola, perchè colorano più o meno intensamente tutti gli elementi dei tessuti; hanno però un'affinità maggiore verso alcuni e minore verso altri, cosicchè riesce poi facile, usando certi reagenti, lasciare il colore soltanto a quegli elementi che hanno per le aniline una

(1) Opera citata, pag. 34.

maggiore affinità. Si può dire che i microrganismi, i nuclei e il protoplasma cellulare costituiscono, dai primi all'ultimo, una scala decrescente di affinità verso le materie coloranti in questione; sicchè il principio generale del loro uso è quello di colorire dapprima intensamente tutti gli elementi del preparato, e togliere poscia successivamente il colorito alle granulazioni ed al protoplasma, lasciando colorati i nuclei ed i microrganismi, oppure decolorare anche i nuclei e lasciare tinti soltanto questi ultimi, i quali spiccano sempre di più sul fondo incoloro, o debolmente colorato.

Riguardo all'azione elettiva, i colori d'anilina sono stati divisi da Ehrlich in *acidi* e *basici,* a seconda che la sostanza colorante funge in quelle combinazioni da acido o da base; i colori acidi tingono in maniera diffusa e uniforme gli elementi dei tessuti, mentre quelli basici colorano più intensamente i nuclei e meno intensamente il resto del tessuto. Anche i microrganismi hanno, come i nuclei cellulari, una speciale affinità pei colori basici d'anilina; cosicchè per la loro colorazione si adoperano esclusivamente questi ultimi, mentre i composti acidi servono bene per la colorazione di contrasto del preparato.

I colori basici che si adoperano più comunemente sono i seguenti:

Violetto di genziana, marca BR, *violetto di metile* 5B, *azzurro di metilene, rosso di fuxina* e *bruno di vesuvina.*

Altri colori basici di uso meno comune sono: il *violetto di dalia,* il *verde di metile,* la *safranina,* la *cianina,* il *rosso di magdala* e *di magenta* e il *bruno di Bismarck.*

Dei colori acidi i più usati sono l'*eosina,* la *fuxina acida,* la *fluoresceina,* e l'*acido picrico* (1).

Non tutti i colori basici sopra enumerati servono egualmente bene per la colorazione di tutte le specie batteriche: giacchè molte di queste hanno un'affinità speciale per una anzichè per un'altra sostanza colorante, ed oltreciò vi sono pure notevoli differenze nel modo col quale quelle sostanze spiegano sui microrganismi la loro azione colorante. Così il violetto di genziana dà una colorazione intensa e duratura, ma se si fa agire lungo tempo dà anche una colorazione eccessiva e diffusa:

(1) Non tutte le sostanze coloranti d'anilina che si trovano in commercio dànno egualmente buoni risultati per la colorazione, e siccome non v'ha una fabbrica unica che le fornisca tutte di buona qualità, ma le migliori provengono da fabbriche diverse, così fa d'uopo ricorrere a quei rivenditori i quali offrono maggiori garanzie per la bontà dei preparati che essi spacciano. Diamo qui l'indirizzo di alcuni rivenditori e fabbricanti, i quali secondo lunga esperienza forniscono le materie coloranti di migliore qualità: Grübler, *Phys-chem. Laboratorium*, Leipzig, Dufourstrasse 17. G. — König, Berlin N. W. Dorotheenstrasse, 35 A. — Trommsdorf, *Chemische Fabrik*, Erfurt. — Berliner Actiengesellschaft für Aninlin-fabrication, Berlin SO, am schlesischen Thor.

invece la tinta del violetto di metile non riesce così facilmente eccessiva, ma è meno resistente. La fucsina poi colora pure intensamente, ed è il colore che fornisce i preparati più eleganti ed anche più duraturi.

L'azzurro di metilene possiede un potere di colorazione molto inferiore ai precedenti ed ha bisogno quindi di un tempo maggiore di azione: ha però il vantaggio che non colora mai diffusamente e fa risaltare bene, anche senza l'aiuto di reagenti speciali, le diverse parti del preparato; cosicchè riesce di un aiuto veramente prezioso per la ricerca, specialmente nei tessuti, di certi microrganismi, la cui colorazione non resiste all'azione delle sostanze decoloranti.

I colori bruni di anilina tingono poco e difficilmente i batterî, ed ora si adoperano quasi esclusivamente per le colorazioni di contrasto. Diciamo soltanto, quasi come ricordo storico, che il bruno di Bismarck veniva usato in addietro per allestire i preparati per la microfotografia; oggi però, dopo l'introduzione delle lastre ortocromatiche ed isocromatiche, non viene più adibito per tale uso.

e) **Soluzioni coloranti.**

Per la colorazione dei batterî i colori d'anilina si adoperano sciolti in mestrui liquidi di varia composizione. Si hanno così diverse specie di soluzioni coloranti, e cioè:

a) *Soluzione acquosa.* — È da premettersi che l'acqua che si usa per le soluzioni coloranti, e per qualsiasi altro scopo in queste ricerche, dev'essere sempre *distillata e sterilizzata.* Si scioglie in generale da 1 a 2 grammi di materia colorante in 100 grammi di acqua, oppure si fa una soluzione acquosa satura, in modo che in fondo alla boccetta rimanga sempre un eccesso di materia colorante, e quando si adopera, si diluisce in un vetrino da orologio pieno d'acqua, fino ad ottenere il grado di colorazione voluta. Se si ha una soluzione piuttosto concentrata, i preparati vi si tengono immersi un tempo minore; ma non è bene che le soluzioni sieno molto dense, perchè in tal caso si ha una colorazione eccessiva che nuoce alla chiarezza del preparato. In generale il liquido colorante, posto in un vetro da orologio sopra fondo bianco, dev' essere ancora trasparente. Le soluzioni acquose sono quelle che colorano meglio, in più breve tempo e più sicuramente: bisogna però sempre filtrarle prima di adoperarle, perchè formano precipitati e si conservano poco a lungo. Si preparano perciò d' ordinario in piccole quantità.

Pei colori bruni di anilina (bruno di Bismarck, bruno d'anilina e vesuvina), i quali non sono solubili nell'alcool e sciolti nell'acqua si alterano facilmente, Koch ha proposto di adoperarli sotto forma di soluzione concentrata in un mestruo composto di parti eguali di glicerina e di acqua. Quando però devono servire soltanto a colorare il fondo del preparato, si adoperano anche questi in soluzione semplicemente acquosa.

b) *Soluzione idro-alcoolica.* — La materia colorante si scioglie nelle stesse proporzioni suesposte, ma il liquido solvente è composto di 1 parte di alcool puro e di 2 parti di acqua. È preferibile fare una soluzione di 2-4 gr. di sostanza colorante in 85 gr. d'acqua con 15 di alcool, il quale serve a ritardare l'alterazione del liquido. Le soluzioni idro-alcooliche abbisognano di un tempo più lungo che quelle acquose per colorire, ma in compenso si conservano più a lungo e non danno una colorazione troppo intensa. Anche queste però debbono essere filtrate prima dell'uso e rinnovate ogni due o tre settimane tutt'al più.

c) *Soluzione alcoolica.* — Per ovviare all'inconveniente della facile alterabilità delle soluzioni suesposte, il meglio si è di preparare di ciascuna delle sostanze coloranti più usuali una soluzione satura nell'alcool assoluto, da diluirsi nell'acqua in proporzione sufficiente ogni volta che si vuole adoperare. Queste soluzioni alcooliche concentrate si preparano mettendo 20-25 gr. di sostanza colorante in 100 gr. di alcool, oppure aggiungendo all'alcool in una boccetta tanta materia colorante, finchè ne rimane una parte sul fondo indisciolta; si lascia a sè qualche giorno, agitando il liquido di quando in quando, e poscia si filtra.

Tali soluzioni si conservano inalterate indefinitamente, ma non si possono adoperare tali quali, perchè come Gunther (1) ha osservato, sono incapaci di colorare sia i batterî che gli elementi dei tessuti; si adoperano quindi diluite nell'acqua in proporzione di $^1/_{10}$ circa del volume di questa, ossia 1 cc. di soluzione alcoolica per ogni 10 di acqua.

Pei colori violetti e per la fuxina è questo il miglior metodo di preparare la soluzione per le colorazioni ordinarie. Per l'azzurro di metilene invece, che contiene molte impurità (destrina ecc.), le quali si sciolgono lentamente e incompletamente nell'alcool e possono quindi precipitare sotto forma di granuli nei preparati, è da preferirsi la soluzione acquosa satura da diluirsi volta per volta, oppure altre soluzioni di cui or ora esporremo le formule, le quali sono dotate della facoltà di conservarsi lungamente.

Comunque sia preparata la soluzione colorante, ricordiamo come principio generale, fondamentale per la tecnica della colorazione il fatto, che le soluzioni dense colorano più prontamente, ma danno anche una colorazione diffusa che difficilmente si corregge coi mezzi decoloranti, mentre invece le soluzioni tenui hanno un'azione elettiva più spiccata e duratura, per quanto colorino più lentamente.

(1) Gunther, *Einführung in das Studium der Bacteriologie*, 1890, pag. 72.

Le soluzioni idro-alcooliche semplici sono quelle che più comunemente si adoperano, specialmente pei preparati che si fanno sui coproggetti, e con buon risultato. Ma il potere colorante di tali soluzioni può essere notevolmente accresciuto mediante l'aggiunta di certe sostanze, le quali agiscono come i mordenti, e che sono principalmente l'olio d'anilina, il fenolo e la potassa o la soda caustica. Le soluzioni preparate coll'aggiunta di queste sostanze si designano in generale col nome di chi per primo le ha proposte, e sono di un uso veramente prezioso per la tecnica della colorazione dei batterî.

Le più usate sono:

a) *Soluzione di Ehrlich.* — È una soluzione idro-alcoolica, in cui all' acqua semplice viene sostituita una *soluzione acquosa satura d'olio d'anilina.* Questa si prepara aggiungendo 4 cc. del così detto « olio d'anilina » del commercio a 100 cc. di acqua, agitando per qualche minuto e filtrando. Al filtrato, che deve essere chiaro e trasparente, si aggiunge la soluzione alcoolica satura di una sostanza colorante, che può essere la *fuxina,* o il *violetto di genziana,* o *il violetto di metile* nella proporzione già indicata.

É da notare che la soluzione acquosa satura d'olio d' anilina, detta dai tedeschi « acqua d' anilina », anche se vi è aggiunto alcool, si altera rapidamente; ed allora le soluzioni coloranti con essa preparate hanno l'inconveniente di imbrattare le preparazioni col deposito di granuli colorati, che non è possibile di togliere con nessun mezzo senza alterare la colorazione.

Per evitare un simile inconveniente, si consiglia da alcuno (Fränkel) di preparare ogni volta estemporaneamente la soluzione Ehrlich in piccola quantità, aggiungendo all'acqua d'anilina in un vetro da orologio la quantità sufficiente di soluzione alcoolica della sostanza colorante che si vuole adoperare.

Un tal consiglio però non è da seguirsi, perchè le soluzioni Ehrlich formano appunto in abbondanza quei precipitati granulosi nelle prime ore dopo la loro preparazione.

Val meglio quindi preparare una certa quantità di soluzione (50 o 100 cc.), lasciarla a sè per una giornata e poscia filtrarla e adoperarla. Se poi non è preparata di recente, bisogna sempre filtrarla prima dell'uso, specialmente se la si deve adoperare per preparazioni che devono lasciarsi con essa un certo tempo a contatto.

Le soluzioni Ehrlich si possono preparare in due modi:

1.° Aggiungendo a 100 cc. di acqua d'anilina 11 cc. di soluzione alcoolica satura di sostanza colorante.

2.° Mescolando, come consiglia Weigert, 3 cc. di olio d' anilina con 15 di alcool assoluto, sciogliendo con questo miscuglio in

un mortaio 1-2 gr. di sostanza colorante ed aggiungendovi, a poco a poco, 85 gr. di acqua.

Dopo 24 ore si filtra e si conserva preferibilmente in boccetta scura.

Comunque sia preparata, la soluzione Ehrlich si altera rapidamente e perde il suo potere colorante; deve quindi essere rinnovata ad ogni 15-20 giorni. Serve specialmente per la colorazione col metodo di Gram e per quella dei bacilli tubercolari.

b) *Soluzione di Ziehl.* — In questa avvi il fenolo in luogo d'olio d'anilina, e la sostanza colorante è la fuxina. Si prepara sciogliendo in un mortaio

1 gr. di fuxina in
10 cc. di alcool assoluto, ed aggiungendovi
100 cc. di soluzione d'acido fenico al 5 %.

Questa soluzione, filtrata, si conserva per un tempo maggiore di quella di Ehrlich, ma non ha un potere colorante egualmente forte. Anche la soluzione Ziehl del resto si altera gradatamente, e deve dopo un certo tempo essere rinnovata.

c) *Soluzione di Kühne* (1). Si prepara sciogliendo in un mortaio 1,5 gr. di azzurro di metilene in 10 gr. di alcool assoluto, ed aggiungendovi 100 gr. di soluzione fenica al 5 %. Kühne la raccomanda come mezzo di colorazione universale dei batterî patogeni, ad eccezione che per quelli della lebbra e della setticemia dei topi.

d) *Soluzioni di Löffler* — Le soluzioni che vanno con questo nome sono due:

1. La prima, che può essere veramente raccomandata come soluzione colorante *universale* dei batterî, si compone di 30 cc. di soluzione alcoolica satura di azzurro di metilene e di 100 cc. di soluzione di potassa caustica nell'acqua in proporzione di 1:10000 (0,01 %).

Questa soluzione colora bene quasi tutti i batterî conosciuti, sia nei preparati sui coproggetti, sia nelle sezioni dei tessuti, e dà una colorazione elettiva molto distinta, che non è mai eccessiva e si conserva inalterata lungamente. Si designa anche col nome di soluzione alcalina *forte* di azzurro di metilene, per distinguerla da quella analoga *debole* di Koch, la quale è composta di

1 cc. di soluz. alcool. satura di azzurro di metilene,
200 gr. di acqua distillata,
0,2 cc. di soluzione potassica al 10 %.

(1) Kühne, *Ueber ein combinirtes Universalverfahren, Spaltpilze in thierischen Gewebe nachzuweisen.* Leipzig. 1887.

2.° L'altra soluzione di Löffler è una soluzione Ehrlich senza alcool, e si compone di

100 cc. di acqua d'anilina,
1 cc. di una soluzione di idrato sodico a 1 %,
4 gr. di fuxina, o di genziana in polvere.

Si aggiunge al liquido la sostanza colorante, si agita e si lascia depositare. Questa soluzione è stata proposta da Löffler per la colorazione delle ciglia dei batterî, dopo averli trattati col mordente, ed ha un potere colorante che supera quello di tutte le altre soluzioni finora accennate.

Per aumentare la potenza di colorazione delle soluzioni coloranti, si sono proposte in luogo dell'olio d'anilina molte altre sostanze, quali la toluidina, la trementina, l'ammoniaca a ½ %, il timolo all'1 ‰, il borato di soda al 5 % e così via. La pratica però ha sancito come le migliori per l'uso le soluzioni, di cui abbiamo sopra dato le formule.

Si è visto finora come il potere colorante di una soluzione possa dipendere:

1.° dalla natura del veicolo;
2.° dal grado di concentrazione.

Vi sono però ancora due altri fattori importanti, che servono a modificare il potere di colorazione delle soluzioni, e questi sono:

1.° la durata del contatto;
2.° la temperatura del liquido colorante.

Quanto al tempo necessario per una buona colorazione, esso varia assai per ciascuna soluzione secondo le specie batteriche e secondo la natura del preparato. Non si può dar quindi nessuna regola al riguardo, e dobbiamo limitarci soltanto ad esprimere il fatto che talora la colorazione si compie facilmente e rapidamente, e tal'altra invece difficilmente, e quindi lentamente.

Quanto alla temperatura, un grado moderatamente alto di essa favorisce la penetrazione della sostanza colorante negli elementi del preparato, e quindi anche nei batterî, e fa sì che la colorazione non solo si faccia più pronta e più intensa, ma resti anche più duratura.

Pei preparati sui coproggetti il riscaldamento si opera tenendo colle pinzette sopra la fiamma il preparato coperto dalla soluzione colorante, finchè si fanno visibili i vapori che se ne svolgono; per le sezioni invece, le quali con un forte riscaldamento possono alterarsi, è preferibile tenerle ad una temperatura più moderata, ed es. a quella di 37° C. nelle stufe, oppure addirittura alla temperatura ambiente per un tempo più lungo.

Riassumendo, quando si vuole ottenere un massimo di colorazione, bisogna adoperare le soluzioni nell'acqua d'anilina o nell'acqua fenicata, tenerle ad una temperatura elevata e farle agire lungo tempo.

f) Reattivi decoloranti.

Ma la tecnica della colorazione dei preparati batterici non si limita soltanto all'azione della sostanza colorante. Per avere un preparato chiaro e ben differenziato nelle varie sue parti, occorre anzitutto portar via da esso quell'eccesso di sostanza colorante che vi resta lassamente adesa; e ciò si ottiene coi così detti *reattivi* o *mezzi decoloranti*.

Di questi il più semplice è l'*acqua*, la quale discioglie e porta seco una certa quantità di colore dal preparato, specialmente se è calda. Un'azione più energica l'esercita l'*alcool diluito*, non l'alcool assoluto, il quale non è affatto un mezzo decolorante, come ha dimostrato Gunther. Questi sono i mezzi che più comunemente si adoperano. Talora però è necessario esercitare un'azione decolorante anche più energica, specialmente per ottenere la colorazione isolata di certi batterî, o quella di contrasto mediante una colorazione successiva del preparato; ed allora si aggiunge all'acqua od all'alcool una certa quantità di acido. Serve bene per ciò l'acido acetico, in proporzione di 0,5 a 1 % di acqua, specialmente quando si voglia fare spiccare la colorazione nucleare (Weigert).

L'acido cloridrico, nitrico e solforico esercitano un'azione decolorante molto più energica, e si adoperano diluiti nell'acqua in proporzione del 20 al 30 %, specialmente nel processo di colorazione dei bacilli tubercolari.

L'azione decolorante più intensa viene esercitata da questi acidi diluiti nell'alcool. La soluzione alcoolica acida che più si adopera è quella di 3 cc. di acido cloridrico in 100 di alcool.

Dopo aver fatto agire tali mezzi decoloranti, bisogna togliere qualsiasi traccia di acido dal preparato, se lo si vuole conservare lungo tempo. Per ottenere ciò si consiglia di lavare abbondantemente con acqua, oppure con una soluzione alcalina neutralizzante. Kühne raccomanda la formula seguente: 6 a 8 goccie di una soluzione acquosa concentrata di carbonato di litina in 10 gr. di acqua. Lo stesso Kühne pel suo metodo generale di colorazione consiglia come mezzo decolorante l'acido cloridrico molto diluito (10 goccie in 500 cc. di acqua).

Nell'uso dei mezzi decoloranti bisogna tener conto del grado di

resistenza che offrono i diversi batterî, una volta colorati, a cedere la loro tinta. In generale tanto più difficilmente si colorano, e tanto più resistono all'azione dei decoloranti.

Detto così delle sostanze coloranti, della maniera di prepararle in soluzione, e dei reattivi decoloranti, passiamo ora a delineare il processo completo di allestimento dei preparati batterici, esponendo dapprima i metodi generali, quelli, cioè, che servono per tutti o almeno per la maggior parte dei batterî patogeni conosciuti, e poscia quelli speciali, i quali servono in modo particolare per la colorazione di certi batterî, o per mettere in evidenza alcune loro particolarità di forma (ciglia), o di sviluppo (spore).

3. Metodi generali di colorazione.

a) Metodo di Weigert, e sue modificazioni.

Weigert è stato il primo ad applicare i colori d'anilina per la dimostrazione dei microrganismi nell'interno dei tessuti, ed il suo metodo, per quanto abbia in seguito subito numerose modificazioni per la colorazione delle diverse specie di microbi, merita pure di essere esposto, perchè rappresenta nelle sue linee fondamentali il metodo che si usa tuttora per le *sezioni* dei tessuti contenenti batterî, ed è il seguente.

Le sezioni di tessuti induriti nell'alcool si tengono in una soluzione acquosa all' 1 % di violetto di genziana per pochi minuti, ottenendo così una colorazione diffusa di tutti gli elementi; per averla localizzata ai nuclei ed ai microrganismi soltanto, si lavano i preparati in una soluzione diluita di acido acetico, si disidratano poscia nell'alcool assoluto, si rischiarano coll'olio di garofani e si chiudono nel balsamo del Canadà sciolto nella trementina. Se la colorazione non è eccessiva, si può anche fare a meno del trattamento coll'acido acetico, giacchè basta l'alcool a togliere il di più della materia colorante ed a far sì che la colorazione rimanga localizzata nella maniera anzidetta. Non bisogna lasciare le sezioni troppo tempo nell'olio di garofani, perchè altrimenti questo finisce col decolorare completamente il preparato.

Per avere una colorazione degli elementi cellulari del tessuto diversa da quella dei batterî, *colorazione doppia*, secondo le prescrizioni dello stesso Weigert, dopo aver trattato le sezioni coll'acido acetico, o coll'alcool, si lavano nell'acqua e si tengono nel picrocarmino per circa 1 ora. Il carmino sostituisce il colore violetto

nei nuclei, i quali restano colorati in rosso, mentre il protoplasma cellulare e tutto il fondo del preparato assume una leggera tinta verdastra, per opera dell'acido picrico. Dal picrocarmino le sezioni si passano in alcool assoluto per disidratarle, e poscia si rischiarano con un olio essenziale e si chiudono nel balsamo, per conservarle, come si dirà più precisamente in appresso, trattando del modo di ricercare i batterî nell'interno dei tessuti animali.

Il metodo primitivo di Weigert suesposto è stato in seguito modificato, ed anche migliorato, sotto varî rapporti.

Una prima modificazione è stata proposta da Koch, prima che Gram trovasse il suo metodo, per ottenere la colorazione isolata dei microbi nei tessuti; essa consiste nel trattare le sezioni, dopo averle colorate nella soluzione idro-alcoolica di fuxina, di violetto di genziana, o di violetto di metile, con una soluzione a metà satura di carbonato di potassa (parti eguali di acqua e di una soluzione satura di carbonato), il quale toglie il colore a tutti gli elementi del tessuto, compresi i nuclei.

Un' altra modificazione fu introdotta da Unna (1) col suo « metodo dello essiccamento », nel quale egli ha sostituito i due ultimi momenti del metodo di colorazione delle sezioni (disidratazione e rischiaramento) coll'essiccazione completa del preparato mediante il calore, riscaldandolo fortemente, come si fa pei preparati sui coprogetti col metodo di Koch.

Da un tal metodo Unna si ripromette il vantaggio di eliminare il pericolo di una soverchia decolorazione, dovuta all'alcool che disidrata e agli olii che rischiarano, e in pari tempo di far meglio risaltare i batterî colorati, come fa il condensatore di Abbe, diminuendo, cioè, l'immagine di struttura del tessuto incoloro, coartato dal calore. Oltre a ciò resta abbreviato l'intiero processo di colorazione, e i preparati si conservano più a lungo.

Di fronte a questi vantaggi, che si debbono realmente riconoscere nel metodo di Unna, sta però l'inconveniente grave che la struttura del tessuto per opera del riscaldamento si altera notevolmente, cosicchè, se in certi casi può veramente un tal metodo riuscire utile, perchè lascia vedere più facilmente e in maggior numero i microbi nei tessuti, allorquando invece interessa nelle sezioni studiare anche la struttura istologica, giova ricorrere ad altri metodi, i quali, pur avendo i vantaggi di questo di Unna, non ne hanno però gl'inconvenienti.

Così Kühne ha proposto di ottenere l'essiccamento delle sezioni

(1) Unna, *Die Entwickelung der Bacterien-färbung*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 3.° 1888, p. 314.

non rapidamente col calore, ma in modo lento soffiando aria sul preparato, asciugato prima con carta bibula, mediante un tubo di vetro a punta sottile, attraverso il quale si spinge l'aria con un apparecchio di gomma da polverizzatore.

Si può anche ottenere egualmente lo stesso scopo, riscaldando leggermente a circa 30° C. il portoggetti su cui sta la sezione, fino a che questa è divenuta perfettamente trasparente.

Ma ad ovviare al pericolo della soverchia decolorazione serve meglio la modificazione proposta da Kühne (1), il quale invece di decolorare cogli acidi, ha proposto l'uso di un altro colore d'anilina, acido, che è la *fluoresceina gialla*, sciolta nell'alcool assoluto in proporzione di 1 su 50, disidratando poscia il preparato non coll'alcool semplice, ma coll'alcool colorato leggermente colla stessa sostanza che si è usata per la colorazione; e ciò nello intento di separare in maniera assoluta il momento della decolorazione da quello della disidratazione, ed evitare così che nel disidratare si decolori ulteriormente il preparato.

Nello stesso intento, quando si adoperi in luogo dell'alcool l'olio d'anilina (Weigert), Kühne suggerisce con vantaggio di colorarlo leggermente, come l'alcool, colla sostanza colorante.

Si prende a tal uopo una piccola quantità (una punta di coltello) di sostanza colorante, la stessa adoperata per colorare il preparato, e si pesta con 10 cc. di olio d'anilina in un mortaio. Lasciato a sè questo miscuglio, a poco a poco, si fa trasparente, ed allora lo si adopera aggiungendone all' olio d' anilina semplice tanto quanto basta per ottenere l'intensità di tinta che si desidera.

b) Metodo di Koch.

Come Weigert è stato il primo ad usare i colori d'anilina per le sezioni dei tessuti, così Koch ha pel primo immaginato di unire la colorazione al processo di fissazione dei liquidi per mezzo del disseccamento, creando così un nuovo metodo di ricerca, che porta appunto il suo nome, e che serve alla colorazione dei *preparati sui coproggetti, fatti coi liquidi distesi in istrato sottile sul vetrino, e quivi fissati col disseccamento rapido a moderato calore* (2).

Tutti i particolari relativi al modo di allestire il preparato sul coproggetti e di fissarvelo si trovano esposti nel capitolo seguente, che tratta della maniera di ri-

(1) Lavoro citato.

(2) Koch, *Verfahren zur Untersuchung*. ecc., Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. II, Heftz 3.

Id. *in Untersuchungen ü. d. Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*, Leipzig. 1878.

Id. in Mittheilungen aus dem kaiserlichen Gesundheitsamte, B. I, 1881.

cercare ed esaminare i batterî contenuti nei liquidi. Per ora diciamo soltanto che ricerche accurate hanno posto fuori di dubbio il fatto, che il disseccamento rapido, operato a temperatura non troppo elevata, non altera sensibilmente nè la forma degli elementi dei tessuti, nè quella dei microbi. Questo vale almeno per la maggior parte dei microparassiti; ve ne ha però di quelli che dopo il disseccamento si fanno più sottili, come ad es. ha osservato Koch a riguardo dei bacilli del carbonchio.

Ciò nonostante è sul fatto della inalterabilità dei microrganismi sottoposti al disseccamento, come pure sull'altro che questi esseri hanno pei colori basici d'anilina un'affinità maggiore degli elementi dei tessuti, che è basato appunto il metodo presente, il quale è altrettanto semplice, quanto sicuro nei suoi risultati.

Lo strato di liquido fissato sul vetrino coproggetti si può colorare in due maniere: o vi si versano sopra alcune goccie d'una soluzione acquosa concentrata d'un colore d'anilina, e ciò quando la colorazione non deve durare che pochi momenti, oppure, se questa deve durare a lungo, si pone la soluzione in un vetrino da orologio e vi si lascia sopranuotare il coproggetti, colla superficie che porta il preparato messa a contatto del liquido. Questo contatto non deve nelle preparazioni ordinarie essere prolungato al di là di 1-10 minuti, perchè, se dura più a lungo, si ottiene una colorazione eccessiva che nuoce alla chiarezza del preparato.

Tutto questo va inteso in maniera affatto generale, essendovi alcuni casi, come è quello in cui si tratta di colorare il bacillo della tubercolosi, nei quali bisogna lasciare il preparato nel liquido colorante per parecchie ore. In ogni caso però si può abbreviare il tempo della colorazione, o renderla, se così si vuole, più intensa, riscaldando il liquido a 45-50° C.

Colorato che sia in tal guisa il preparato, si può semplicemente lavarlo bene con acqua distillata e porlo sul portoggetti con una goccia d'acqua, per osservarlo al microscopio, oppure si usano le sostanze decoloranti, quali sono la potassa in soluzione diluita (1 : 10), l'acqua leggermente acidulata con acido acetico ($^1/_2$ $^0/_0$), o meglio di tutto l'alcool, fatto agire però rapidamente. È da consigliarsi sempre di non colorare eccessivamente le preparazioni, per fare a meno anche dell'alcool, il quale fa scomparire facilmente certe particolarità dei microparassiti: così le capsule dei pneumococchi trattate coll'alcool si scolorano facilmente. Se le preparazioni si vogliono conservare, si fanno disseccare rapidamente, passando di nuovo i coproggetti, colla superficie che porta lo straterello rivolta all'insù, sulla fiamma d'una lampada, vi si pone sopra una goccia di balsamo del Canadà, si applicano sul portoggetti e si conservano. Quando però si voglia avere un criterio esatto delle dimensioni d'una data forma di microrganismi, è necessario farne l'esame

diretto nell'acqua; giacchè se si disseccano di nuovo e si chiudono nel balsamo, come si deve fare per conservarli, si ha sempre in essi un certo grado di retrazione.

Preparazioni fatte in tal guisa mostrano colorati soltanto i nuclei e gli elementi parassitarî, i quali specialmente appaiono molto evidenti.

Tutti i microparassiti finora conosciuti si colorano, qual più qual meno intensamente e rapidamente, col metodo suesposto; non fanno eccezione neanche i bacilli tubercolari, pei quali si era prima ammessa la necessità di un processo specifico di colorazione.

c) **Metodo di Gram.**

Un altro metodo generale di colorazione, che serve bene tanto pei preparati sui coproggetti, come per le sezioni, è quello proposto da Gram (1). Questo metodo ha il vantaggio su quelli di Koch e di Weigert, di lasciare incolori tutti gli elementi del preparato, all'infuori dei microrganismi, e di evitare così l'inconveniente, che quando si tratta di tessuti molto ricchi di elementi nucleati (milza, ghiandole linfatiche, polmoni infiammati, tessuto di granulazione, ecc.), gli elementi parassitarî rimangano coperti dall'imagine dei nuclei, specialmente se quelli sono sottili e poco colorati, e se la sezione del tessuto riesce un po' meno che sottile. Col metodo presente invece i soli microrganismi rimangono colorati e gli altri elementi del tessuto restano incolori, quasi del tutto: cosicchè, anche se vi esiste soltanto qualche microparassita isolato, lo si può col microscopio rintracciare facilmente.

La specialità del metodo di Gram, di decolorare i nuclei cellulari lasciando colorati i microrganismi (non tutti però), è dovuta all'azione dello jodio, il quale sciolto nell'acqua in unione collo joduro potassico, ha la proprietà di formare colla sostanza colorante d'anilina di cui è tinto il preparato un precipitato che resta tenacemente aderente soltanto ai microbi, mentre vien disciolto e portato via dal resto del preparato per mezzo dell'alcool.

Il metodo di Gram è composto dei momenti seguenti:

1.° Colorazione del preparato (sul coproggetti, o sezione) nella soluzione Ehrlich di genziana, o di violetto di metile, per qualche minuto.

2.° Immersione per 1 o 2 minuti nella soluzione jodo-jodurata (pag. 127) dove il preparato prende una tinta bruno-scura.

(1) Gram C., *Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trochenpräparaten*, Fortschritte d. Medicin. 1884. N. 6.

3.° Lavamento nell'alcool fino a decolorazione quasi completa.

4.° Trattamento coll'olio di garofani, nel quale il preparato si rischiara, e perde ancora un resto di colorazione. Si toglie con carta bibula l'olio di garofani, e si chiude nel balsamo.

In tal modo restano colorati i microrganismi e si decolora tutto ciò che è di tessuto animale, ad eccezione di alcuni suoi componenti, che talora si trovano nel preparato e che col metodo Gram, semplice o modificato come ora si dirà, restano sempre colorati in un coi microbi, e cioè:

Le così dette « cellule granulose » di Ehrlich (Mastzellen dei tedeschi), lo strato corneo dell'epidermide, il rivestimento sieroso degli organi interni e i nuclei in cariocinesi.

Il metodo di Gram si può combinare con una colorazione di contrasto dei nuclei e del fondo del preparato, mediante una soluzione acquosa di vesuvina, oppure di eosina o di safranina. Se si tratta però di micrococchi, può accadere facilmente che restino anch'essi colorati dalla vesuvina, oppure che l'eosina li decolori. Riesce meglio perciò combinare col metodo Gram la colorazione col picrocarmino, ottenendo prima con questo la colorazione nucleare, e sottoponendo poscia i preparati alle varie manipolazioni del metodo Gram. In tal modo si ottengono preparati di un bellissimo effetto e assai dimostrativi, specialmente per lo studio dei rapporti che assumono i batterî colle varie parti dei tessuti animali.

Ad ovviare a due inconvenienti che offre spesso questo metodo, e che sono la incompleta decolorazione dei nuclei cellulari, e il deposito sul preparato di goccioline colorate, che l'alcool non discioglie, Gunther (1) ha proposto un'utile modificazione, che consiste nel trattare i preparati, oltrechè coll'alcool semplice, con alcool acidificato con acido cloridrico al 3 %. Gunther ha sostituito inoltre l'olio di garofani col xilolo, per evitare un'eccessiva decolorazione.

Il metodo Gram-Gunther si pratica adunque come segue:

1.° Colorazione nella soluzione Ehrlich di genziana, o di violetto di metile, per 1-2 minuti.

2.° Immersione nella soluzione jodo-jodurata per 2 minuti.

3.° Immersione nell'alcool per $^1/_2$ minuto.

4.° Immersione nell'alcool acido (HCl 3 %) per 10 secondi, esattamente.

5.° Lavamento nell'alcool semplice per qualche minuto, finchè il preparato non perde più colore.

6.° Rischiaramento col xilolo e chiusura nel balsamo sciolto nel xilolo.

(1) Deutsche medicinische Wochenschr. N. 22, 1887.

Anche con questo metodo si può combinare la colorazione doppia, come sopra si è detto.

Un'altra modificazione importante al metodo di Gram è quella introdotta da Weigert (1) per impedire che l'alcool eserciti la sua azione decolorante anche sui microrganismi. Egli ha proposto di usare in luogo dell'alcool l'olio d'anilina, il quale decolora e disidrata nello stesso tempo, senza togliere il colore ai microrganismi. Il preparato, dopo averlo trattato colla soluzione jodo-jodurata, si distende sul portoggetti, si asciuga con carta bibula e vi si versa sopra l'olio d'anilina, rinnovandolo anche due o tre volte, finchè rimane incoloro; si asciuga poscia con carta bibula, si rischiara col xilolo e si chiude nel balsamo.

Con questo metodo restano colorate anche la fibrina e la sostanza ialina, le quali non di rado si trovano nei tessuti patologici, e che può riescire utile veder colorate insieme ai microrganismi.

Ricordiamo infine che, se si tratta di sezioni, è preferibile far loro subire tutti i diversi trattamenti del metodo Gram tenendole sul coproggetti, anzichè passarle colla spatola nei diversi liquidi entro i vetri da orologio, giacchè nei molteplici trasporti facilmente si accartocciano, oppure si rompono.

Bisogna avvertire che pel metodo Gram servono soltanto le soluzioni Ehrlich e solamente i colori appartenenti al gruppo delle « Pararosaniline », come ha trovato Unna (2), vale a dire il violetto di genziana e di metile e l'azzurro Vittoria.

La fuxina, l'azzurro di metilene e i colori bruni pel metodo Gram non servono, perchè hanno per lo jodio una debole affinità. Avvertiamo infine che non tutti i microrganismi resistono a questo metodo, ma alcuni si decolorano come gli elementi dei tessuti. Dei batterî patogeni conosciuti quelli che con tal metodo non restano colorati sono: i bacilli dell'edema maligno, del carbonchio sintomatico, della difterite, del tifo, della morva, della così detta « setticemia emorragica » (colèra dei polli, setticemia dei conigli, ecc.) e del colera asiatico, il pneumobacillo di Friedländer, lo spirocete d'Obermeyer, il gonococco di Neisser e il bacillo dell'influenza. Tutti gli altri, compresi i bacilli della lebbra e della tubercolosi, pei quali, come si dirà, è necessario un contatto più lungo colle soluzioni coloranti, si colorano bene col metodo Gram.

d) Metodo di Koch Loeffler.

È questo un metodo generale di colorazione, che fu proposto da Koch e descritto da lui nella sua celebre memoria sulla tubercolosi (3). Un tal metodo ha nulla di speciale, all' infuori che in

(1) *Weigert, Ueber eine neue Methode Zur Färbung von Fibrin und von Mi-*
(2) Unna, *Die Rosaniline und Pararosaniline. Eine bactericolgische Far-kroorganismen.* Fortschritte der Medicin, N. 8, 1887.
(3). Koch, *Die Aetiologie der Tubercolose*, Berl. klin. Wochenschr. N. 15. 1882, *benstudie* Leipzig, 1887.

esso, invece delle ordinarie soluzioni dei colori d'anilina, si adopera *l'azzurro di metilene sciolto nell'acqua debolmente alcalinizzata* con potassa caustica, la quale aumenta il potere colorante dell'azzurro di metilene. Koch nel lavoro sopra citato consiglia la soluzione debole di questa sostanza, di cui si è data la formula a pag. 135. Löffler (1) ha modificato il processo primitivo di Koch, adoperando una soluzione più concentrata di azzurro di metilene, e ne ha esteso l'applicazione alla colorazione di tutte le specie di batterî patogeni. Questi infatti colla soluzione Löffler si colorano tutti assai bene, eccettuati i bacilli della lebbra, i quali coll'azzurro di metilene, sia pure in soluzione alcalina, non si colorano che poco o nulla. I preparati, colorati per un tempo diverso, a seconda dei casi, nella soluzione alcalina concentrata di azzurro di metilene, si tengono per pochi secondi in una soluzione acquosa di acido acetico a 0,5 %, per 5 minuti nell'alcool diluito per metà con acqua, e 15 minuti nell'alcool assoluto. Si rischiarano coll'olio di legno di cedro e si chiudono nel balsamo.

Il metodo di Löffler serve pei preparati sui coproggetti, ma serve bene specialmente per le sezioni di organi, in ispecial modo se in questi si tratta di mettere in evidenza mediante la colorazione alcune specie di batterî, i quali, come quelli del tifo e della morva, non resistono al metodo Gram, e cogli altri metodi si colorano difficilmente e facilmente perdono il loro colore.

e) Metodo di Kühne.

Con questo, che è l'ultimo finora proposto, chiudiamo la serie dei metodi, così detti generali, di colorazione dei batterî. Esso serve egualmente bene pei preparati sui coproggetti, come per le sezioni, e la sostanza colorante che in esso si adopera è, come nel precedente, l'azzurro di metilene, sciolto però nell'acqua con acido fenico al 5 %.

Questa soluzione, secondo le prescrizioni di Kühne (2), si prepara sciogliendo prima in un mortaio gr. 1, 5 di azzurro di metilene in 10 cc. di alcool assoluto, ed aggiungendo poscia, a poco a poco, 100 cc. di soluzione fenica al 5 %.

Gli altri reagenti che si adoperano per questo metodo sono:

1.° Acqua acidulata con HCl nelle proporzioni di 10 goccie per 500 cc. di acqua.

(1) Löffler, Mitth. a. d. kais. Ges., Bd. II, 1884, p. 439.

(2) Kühne, *Praktische Anleitung zum mikroskopischen Nachweis der Bacterien im thierischen Gewebe*, Leipzig, 1888.

2.° Soluzione di carbonato di litio, preparata aggiungendo 6-8 goccie di una soluzione acquosa concentrata di tale sostanza a 10 cc. di acqua.

3.° Olio d'anilina colorato leggermente con azzurro di metilene, come si è già detto.

I preparati sui coproggetti, secondo questo metodo, si tengono per 5 minuti a contatto della soluzione colorante fenicata, si lavano con acqua, si decolorano nell'acqua acidulata con HCl fino a che il preparato ha preso una tinta azzurro-chiara, si lavano nell'acqua di litina, si lavano ancora una volta sotto un filo di acqua semplice per pochi secondi, si asciugano colla corrente d'aria prodotta mediante una palla di gomma elastica, si riscaldano leggermente sulla fiamma per disseccarli completamente, si rischiarano col xilolo e si chiudono nel balsamo.

Se si tratta di sezioni, queste si passano dall'alcool nella soluzione colorante, dove si tengono per circa mezz'ora (se si tratta di bacilli della tubercolosi e della lebbra 1-2 ore); si lavano nell'acqua e si immergono nell'acqua acidulata con HCl finchè il colore è addivenuto azzurro-pallido; si lavano poscia nell'acqua di litina, si lasciano per qualche minuto nell'acqua distillata, e da questa si passano, soltanto per qualche momento, nell'alcool assoluto, semplice o colorato con azzurro di metilene; dall'alcool si portano nell'olio d'anilina colorato in azzurro, dove si tengono per qualche minuto, per ottenerne la disidratazione completa (1). Si lavano infine nell'olio d'anilina puro, si tengono per 4 minuti in un olio essenziale molto fluido (terebene, timene), il quale rischiara le sezioni e porta via in pari tempo l'olio d'anilina, si immergono nel xilolo per togliere qualsiasi traccia d'olio d'anilina, e si chiudono nel balsamo.

Il metodo di Kühne merita invero il nome di «metodo generale», a preferenza di tutti gli altri già esposti, perchè serve bene nella grande maggioranza dei casi, anche quando si tratta di colorare batterî, che sono assai difficili a mettere in evidenza nei tessuti, come sono quelli della morva e del colèra dei polli. Tuttavia anche in esso esiste una qualche lacuna, giacchè vi sono due specie di bacilli, quello della lebbra e quello della setticemia dei topi, i quali con un tal metodo si colorano soltanto in parte e in maniera poco evidente.

(1) Il passaggio rapido nell'alcool ha per iscopo di togliere alle sezioni quel tanto di acqua che è necessario perchè esse si distendano nell'olio d'anilina.

4. Metodi speciali di colorazione.

Di questi metodi alcuni servono a mettere in evidenza certe proprietà morfologiche dei batterî, come sarebbero le ciglia, le capsule e le spore, ed altri invece sono specialmente adatti per la colorazione di alcune specie batteriche, le quali sotto qualche riguardo si comportano diversamente dalle altre di fronte alle sostanze coloranti d'anilina.

a) Colorazione delle ciglia.

Si è già detto come nei microrganismi dotati di movimenti proprî siasi scoperta l'esistenza d'organi speciali, che pel loro aspetto filiforme son detti *ciglia*.

Queste ciglia, le quali nella cellula batterica vivente sono difficilissime a vedersi, si possono, secondo Koch, rendere visibili anche senza colorazione, includendo i preparati nella soluzione concentrata (1 : 2) di acetato di potassa. Ad ogni modo si riesce però più agevolmente nello intento mediante la colorazione, specialmenle ora che per opera di Löffler il metodo di colorazione delle ciglia è stato perfezionato tanto da metterlo, come gli altri metodi, alla portata di tutti.

Prima di passare ad esporre il metodo di Löffler accenniamo di volo a quello primitivo col quale Koch (1) riuscì pure a colorare gli organi di movimento di alcuni batterî. I preparati di batterî, fissati sui coproggetti col riscaldamento o cogli acidi osmico e cromico, si trattano con una soluzione acquosa concentrata di estratto di campeggio, che colora le ciglia in bruno, e si fissa poscia questa colorazione mediante il trattamento successivo con una soluzione di acido cromico a 0,5 %, o col liquido di Müller. I preparati, dopo averli lavati con acqua, s conservano nella glicerina, oppure si disseccano e si chiudono nel balsamo. Con tal modo però non sempre si riesce a mettere le ciglia in evidenza.

Il metodo di Löffler (2) consta di due momenti ben distinti: trattamento del preparato con un liquido *mordente*, e successiva sua *colorazione*.

Le formule dei liquidi che per esso si adoperano e la maniera di prepararli sono i seguenti:

(1) Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1877, p. 419.

(2) Löffler, *Eine neue Methode zum Färben der Mikroorganismen im besonderen ihrer Wimperhaare und Geisseln*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. 6, 1889, p. 209. — Id., *Weitere Untersuchungen über die Beizung und Färbung der Geisseln bei den Bacterien*. Ibidem, Vol. 7, 1890, p. 625.

1.° *Soluzione mordente.* Si prepara aggiungendo a 10 cc. di una soluzione acquosa di acido tannico (20 gr. in 80 di acqua) 5 cc. di una soluzione satura, a freddo, di solfato di ferro e 1 cc. di soluzione acquosa, od alcoolica, di fucsina (o di violetto di metile): si forma in tal modo il così detto « inchiostro di fucsina », il quale viene acidificato, oppure alcalinizzato, a seconda della specie batterica di cui si debbono colorare le ciglia.

2.° Soluzione a 1 % di idrato di sodio.

3.° Soluzione di acido solforico titolata in modo, che neutralizzi esattamente un egual volume della soluzione alcalina N. 2.

L'una o l'altra di queste due soluzioni si aggiunge, a goccia a goccia, a quella N. 1 per darle il grado voluto di alcalinità, o di acidità, che l'esperienza dimostra ottimo per ciascuna specie batterica; giacchè Löffler, in base al lavoro di Petruschky (1) sulla produzione di alcali e di acidi per opera dei batterî, ha trovato che, se si tratta di microbi produttori di *alcali*, bisogna acidificare il mordente colla soluzione di acido solforico, e se invece si tratta di microrganismi produttori di *acidi*, bisogna aggiungere a quello la soluzione di soda. Così, ad es., secondo le esperienze di Löffler, si devono aggiungere per ogni 16 cc. di liquido mordente 22 goccie di soluzione N. 2 pel bacillo del tifo e 36 goccie per quello dell'edema maligno e del carbonchio sintomatico; ed invece devonsi aggiungere della 3.ª soluzione 5-6 goccie pel bacillo del pus turchino, $^1/_2$-1 goccia pel bacillo del colèra e 3-4 goccie per lo spirillo di Metschnikoff.

4.° *Soluzione colorante.* Si prepara anzitutto una soluzione satura di fucsina nell'acqua d'anilina (mettendo in 50 cc. di acqua d'anilina 2-2 $^1/_2$ gr. di fucsina polverizzata, agitando finchè si scioglie e filtrando), ed a questa si aggiunge, a goccia, a goccia, una soluzione di idrato sodico a 0,1 % (preparata diluendo 10 volte la soluzione N. 2), finchè la soluzione di fucsina da trasparente che era comincia a diventare opaca: si filtra e si adopera come ora si dirà.

Perchè il metodo Löffler dia buoni risultati bisogna avere specialmente due avvertenze:

1.° Che i vetrini coproggetti, che si adoperano per le preparazioni, sieno perfettamente puliti. A tale scopo si tengono dapprima immersi in una soluzione di acido solforico concentrato riscaldato, si lavano con acqua, e si puliscono infine con una pezzuola di bucato bagnata in un miscuglio a parti eguali di alcool e di ammoniaca. Tali pratiche sono necessarie, perchè se al vetrino resta aderente una qualche impurità, basta questa per impedire che il liquido bagni il vetrino, o per produrre precipitati che guastano la preparazione.

2.° Che i batterî sieno ben isolati, e che non restino ad essi

(1) Petruschky, *Bakterio-chemischen Untersuchungen*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. 7, 1889, p. 1.

aderenti particelle albuminose del materiale nutritivo, le quali formano precipitati che si colorano intensamente, nascondendo o rendendo incerta l'osservazione delle ciglia. È per ciò che servono meglio le culture giovani (6-8 ore di sviluppo), fatte sulla superficie dell'agar o del siero di sangue solidificato.

Ciò premesso, ecco come si procede. Si preparano 4 o 5 coprogetti, puliti come sopra, e su ciascuno di essi si depone una goccia di acqua comune, o distillata, sterilizzata (1): si prende coll'ansa di platino una piccola quantità di materiale della cultura e si diluisce in una prima goccia; da questa prima diluzione si prende egualmente un po' di materiale coll'ansa e si diluisce nella 2.ª goccia; e da questa nella 3.ª, nella 4.ª ed anche nella 5.ª goccia, fino ad avere una diluzione tale, che i singoli batterî restino isolati e possibilmente privi di sostanze albuminose. Le goccie si distendono delicatamente coll'ansa di platino sul vetrino; si vede allora se questo è ben pulito, giacchè in tal caso l'acqua deve subito bagnare il vetro e distendersi su di esso in lamina sottile, senza raccogliersi in goccioline; si lascia disseccare all'aria, e si fissa il preparato col calore passandolo, come al solito, per tre volte sulla fiamma, senza però riscaldarlo soverchiamente. Un tal momento dell'operazione è specialmente importante per la riuscita di questa, perchè se si riscalda troppo, l'azione del mordente sulle ciglia più non si esercita. È per ciò che Löffler consiglia di tenere il vetrino fra il pollice e l'indice, invece che colle pinze, per sorvegliare colla mano che il calore non sia soverchio. Sul vetrino ancora caldo si versa la soluzione mordente, fino a coprirlo, e si riscalda con cautela sulla fiamma, finchè si fa visibile lo svolgimento dei vapori, evitando anche questa volta un soverchio riscaldamento, il quale darebbe luogo al deposito sul vetrino di uno strato granulare di mordente, che non si discioglie più e che si colora poscia intensamente. La soluzione mordente così riscaldata si lascia agire per circa 1 minuto, facendo scorrere il liquido su e giù sul vetrino, e poscia si lava sotto un forte zampillo d'acqua distillata, si lava ancora nell'alcool assoluto, finchè il vetrino appaia perfettamente chiaro e lasci vedere soltanto colorati leggermente i punti dove sono raccolti i batterî penetrati dal mordente, e finalmente si versa sul preparato asciutto la soluzione colorante, recentemente filtrata, che si riscalda sulla fiamma per un altro minuto fino allo svolgimento visibile dei vapori. Si lava con acqua, si lascia asciugare e si chiude nel balsamo.

(1) È da preferirsi, secondo Löffler, l'acqua comune a quella distillata, perchè questa spegne rapidamente la mobilità di alcuni batterî e può forse alterarne anche le ciglia.

L'osservazione del preparato dev'essere fatta nelle migliori condizioni possibili di ingrandimento e di illuminazione.

Ho insistito alquanto sui particolari di un tal metodo, di per sè abbastanza complicato, perchè se non si seguono appuntino le norme stabilite, la colorazione non riesce.

Quasi contemporaneamente a Löffler, e indipendentemente da lui, Trenkmann (1) ha adoperato per la colorazione delle ciglia un metodo basato sullo stesso principio di quello di Löffler, ma più imperfetto di questo. Nella seconda comunicazione fatta sullo stesso argomento Trenkmann dice di aver perfezionato il suo metodo e ne espone i particolari, i quali diversificano alquanto da quelli del metodo di Löffler. Questo di Trenkmann sarebbe meno complicato, ma richiede per la sua esecuzione un tempo assai lungo (12 ore e più): tralasciamo perciò di esporne i particolari. Egli ha osservato inoltre che si riesce a colorare le ciglia coi colori d'anilina, anche senza il mordente, esponendole prima ad elevata temperatura (210°C.) come le spore. La sostanza delle ciglia avrebbe adunque una composizione simile a quella delle spore, giacchè si comporta come questa di fronte all'azione dei colori d'anilina. Strauss (2) ha poi proposto di colorare le ciglia dei batterî allo stato vivente, mescolando sul portoggetti una goccia di cultura nel brodo con un'altra piccola goccia di liquido di Ziehl diluito con 3-4 parti d'acqua.

Ricordiamo infine che Messea (3), il quale ha descritto esattamente il metodo Löffler, applicandolo alla colorazione delle ciglia di alcuni batterî, sui quali non era stato ancora applicato, ha proposto di basare sulla presenza e sui caratteri (posizione e numero) delle ciglia una classificazione sistematica dei microrganismi. Non crediamo opportuno esporre i particolari di una tale classificazione, perchè se si ritiene imperfetta e unilaterale quella di Cohn, basata sulla sola forma della cellula batterica, la quale però è abbastanza bene definita, altrettanto deve dirsi, per lo meno, di quella di Messea, basata su di un carattere morfologico, difficile a studiarsi e non ancora intieramente conosciuto.

Per quanto il metodo di Löffler segni un progresso grande ed incontestabile nella tecnica della colorazione delle ciglia, non possiamo però a meno di rilevare il fatto, che il detto metodo, oltre all'essere alquanto complicato, non dà buoni risultati che in mano dei più esperti, e spesso anzi non riesce completamente per motivi difficili a precisare. È perciò da segnalarsi con piacere qualsiasi tentativo fatto per trovare un metodo più facile e più sicuro, come appunto ha cercato di fare Sclavo (4) per la colorazione delle ciglia di alcuni batterî.

Il metodo proposto da Sclavo è il seguente:

(1) Trenkmann, *Die Färbung der Geisseln von Spirillen und Bacillen*, I Mittheilung. Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. 6, 1889, p. 433. II Mittheilung., Ibid. Vol. 8, 1890, p. 386.

(2) Semaine medicale, 1892, pag. 252.

(3) Messea, *Contributo allo studio delle ciglia dei batterî e proposta di una classificazione*. Rivista d'igiene e sanità pubblica, Anno I, 1890, N. 14.

(4) Sclavo, *Di un rapido processo per la colorazione delle ciglia di alcuni microrganismi*, Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1892, pag. 653.

I preparati, allestiti sui vetrini come pel metodo Löffler e lasciati disseccare all' aria al riparo dalla polvere, senza passarli sulla fiamma, si immergono per 1 minuto in una soluzione di acido tannico 1 % nell'alcool al 50 %, si lavano con acqua distillata, si immergono per 1 minuto in una soluzione acquosa di acido fosfovolframico al 5 %, si lavano di nuovo, e diligentemente, con acqua distillata, e si tengono per 4-5 minuti in una soluzione satura di fucsina nell'acqua d'anilina, leggermente riscaldata: si lava infine con acqua distillata, si asciuga con carta e si chiude nel balsamo sciolto nel xilolo.

Con tal metodo Sclavo ha colorato le ciglia di alcuni microrganismi (*B. cyanogenus*, *megaterium*, *mesentericus vulgatus*, *Pr. vulgaris* e *mirabilis*) e di altri no (spirillo di Koch, di Metschnikoff e di Deneke, *B. coli*).

Anche il metodo di Sclavo, adunque, per quanto più facile e più spiccio di quello di Löffler, non può ancora sostituirlo completamente, non essendo applicabile per tutti i microrganismi ciliati.

Coll'aiuto della colorazione si è trovato anzitutto, che non soltanto le specie mobili di bacilli e di spirilli sono provviste di ciglia, ma che anche le forme di cocco possono averne. Löffler ha dimostrato appunto col suo metodo la presenza delle ciglia nel *micrococcus agilis*. Si è visto inoltre che, mentre alcuni batterî (quello del coléra ad es.) hanno un filamento soltanto ad una delle estremità, altri invece (*spirillum volutans*) ne hanno uno per ciascuna estremità, oppure un ciuffo (bacillo del latte bleu) ad un'estremità soltanto, ed altri finalmente hanno parecchie ciglia laterali (bacillo del tifo e proteo vulgare).

b) Colorazione delle capsule.

La capsula di cui sono circondati alcuni batterî patogeni, specialmente nell'interno dell'organismo animale che essi infettano, nei preparati fatti coi metodi ordinarî di colorazione resta incolora, e si vede tutt'al più come un alone chiaro a contorno regolare, circondante il microrganismo. Si può però anche ottenerne la colorazione, mediante leggere varianti nei metodi di colorazione semplice.

A tale scopo Ribbert ha proposto di adoperare la stessa soluzione usata da Ehrlich per colorare le granulazioni delle cellule granulose (Mastzellen), così composta:

Acqua 100 gr., alcool 50 gr., acido acetico 12,5 gr. Si riscalda questo miscuglio e si aggiunge violetto di dalia fino a saturazione. I preparati fatti sui coproggetti si immergono per pochi

istanti in questa soluzione e si lavano poscia con acqua. Le capsule restano colorate in un tono più chiaro che i microrganismi.

Friedländer per colorare le capsule del suo così detto «pneumobacillo» ha pure proposto un metodo consimile. I preparati, sia sui coproggetti, sia di sezioni, si tengono per 24 ore in una soluzione acida di genziana, composta da 100 gr. di acqua, 50 di soluzione alcoolica concentrata di violetto di genziana e 10 di acido acetico; si decolorano poscia nell'acqua acidulata con acido acetico a 0,1 % e si trattano come d'ordinario.

Pei preparati sui coproggetti Friedländer consiglia pure di immergerli, dopo averli fissati col calore, nella soluzione di acido acetico a 1 % per due o tre minuti, di essiccarli coll'aria soffiatavi sopra mediante un tubo ad estremità sottile, di colorarli nella soluzione Ehrlich di genziana e lavarli infine con acqua.

Per mio conto posso dire che, sia pel bacillo di Friedländer, come per quello del carbonchio nel sangue e pel proteo capsulato, sono riuscito facilmente ad ottenere la colorazione delle capsule dello stesso colore, un po' più sbiadito di quello dei bacilli, senza ricorrere a nessuno dei metodi suddetti, ma semplicemente trattando i preparati colla soluzione Ehrlich di genziana, e decolorandoli poscia rapidamente coll'alcool comune. Si può anche ottenere una colorazione doppia delle capsule in rosso-roseo e dei bacilli in violetto, trattando i preparati decolorati coll'alcool con una soluzione acquosa tenue di eosina.

c) Colorazione delle spore.

Coi metodi ordinarî di colorazione, che servono per colorare i batterî, le spore endogene non si colorano, perchè la membrana compatta e resistente che le circonda impedisce la penetrazione della sostanza colorante. E difatti, se un preparato di cultura sporigena del bacillo carbonchioso si colora con una soluzione idralcoolica semplice, si vedono colorati i bacilli, e le spore appaiono, o libere o nell'interno di quelli, come corpi ovoidali splendenti e incolori.

Per colorare le spore sonvi due metodi differenti.

Col primo si pongono in azione tutti quei momenti che valgono ad aumentare il potere colorante dei colori d'anilina; si adoperano, cioè, le soluzioni che colorano più intensamente, si riscaldano e si fanno agire per lungo tempo. Si prendono perciò le soluzioni Ehrlich di fucsina o di genziana, a preferenza anche della soluzione Ziehl di fucsina, e se ne versano alcuni cc. in un vetrino da orologio; vi si pongono a sopranuotare i coproggetti col preparato fissato sulla

fiamma come d'ordinario, e si riscalda la soluzione fino alla comparsa dei vapori visibili, ripetendo l'operazione ogni 2-3 minuti per 5-6 volte, secondo la specie dei microrganismi.

Quando si tratta di spore molto difficili a colorarsi, come sono quelle del bacillo carbonchioso, è preferibile riscaldare una volta la soluzione colorante, come sopra, e lasciarvi poscia i preparati 24 ore entro un termostato a 37° C. Dal liquido colorante si passano nell'alcool assoluto, dove tutto il resto si decolora e restano colorate soltanto le spore.

Si può ottenere facilmente anche la colorazione doppia delle spore e dei bacilli, trattando successivamente il preparato con un'altra soluzione colorante. I più bei preparati di colorazione doppia si ottengono adoperando la soluzione Erhlich di fucsina, come sopra è detto, decolorando per 1 minuto nell'alcool assoluto contenente il 3 % di ac. cloridrico, lavando in acqua e colorando poscia rapidamente in una soluzione acquosa fredda di azzurro di metilene. Le spore restano colorate in rosso intenso e i bacilli in azzurro.

Le spore endogene dei diversi batterî, come sono diversamente resistenti verso l'azione degli agenti nocivi esterni, così si lasciano più o meno facilmente penetrare dai colori d'anilina. Difatti, mentre alcune, come quelle del bacillo carbonchioso, si colorano assai difficilmente, le spore di altri bacilli non patogeni, come quelle del bacillo megaterio, si colorano più rapidamente, ed altre infine si colorano perfino colle soluzioni idralcooliche ordinarie. È perciò che nel processo sopra descritto deve variare, secondo i casi, il tempo di contatto colla soluzione colorante ed anche il trattamento successivo per la doppia colorazione.

L'altro metodo per la colorazione delle spore è basato sul fatto, osservato contemporaneamente da Buchner e da Hueppe, che la temperatura elevata, fatta agire lungo tempo, rende le spore facilmente penetrabili dalle sostanze coloranti.

Buchner, partendo dal fatto che i batterî viventi non si colorano, mentre quelli uccisi col fissamento sul vetrino coproggetti si colorano facilmente, ha supposto che la non colorabilità delle spore fosse egualmente una proprietà inerente alla vita di queste. Egli pensò allora di uccidere le spore, per renderle permeabili ai colori, sia immergendole negli acidi minerali concentrati, sia esponendole ad una temperatura elevata.

Secondo il metodo di Buchner e Hueppe, i preparati di materiale sporigeno si tengono per $^1/_4$ d'ora a $^1/_2$ ora nella stufa ad aria secca a 180-200° C., oppure si fanno passare 8-10 volte attraverso la fiamma: dopo di ciò le spore hanno acquistato la facoltà di colorarsi anche colla soluzione acquosa dei colori d'anilina, mentre invece i bacilli non si colorano più.

Come appendice alla colorazione delle spore, diciamo qualche cosa sulla colorazione dei così detti « granuli sporigeni » dei batterî. Questi granuli, i quali si comportano verso i colori d'anilina diversamente dal resto del contenuto della cellula batterica, da alcuni sono interpretati come uno stadio iniziale della sporificazione, mentre secondo altri sarebbero composti da sostanza nucleare (cromatina), e la loro presenza sarebbe in relazione col processo di scissione della cellula batterica. Queste granulazioni si colorano bene col metodo proposto da Ernst (1), che consiste nel versare sul preparato fissato sul coproggetti alcune goccie di soluzione Löffler di azzurro di metilene, riscaldarlo sulla fiamma fino allo svolgimento di vapori visibili (senza però riscaldare fino all'ebollizione), lavarlo con acqua e colorare successivamente con una soluzione acquosa di bruno di Bismarck.

Anche senza la doppia colorazione, si riesce a mettere in evidenza quei granuli col metodo di Babes (2), di colorazione semplice (per 15 minuti) colla soluzione Löffler non riscaldata, la quale tinge i granuli in rosso o rosso-violetto e i batterî in azzurro chiaro.

Veniamo ora ai metodi speciali, che sono più adatti per la colorazione di certe singole specie batteriche, le quali si comportano verso i colori d'anilina diversamente dalle altre.

d) Colorazione dei bacilli tubercolari.

Il processo di colorazione dei bacilli della tubercolosi è di molta importanza, sia perchè questi si comportano di fronte alle sostanze coloranti in una maniera speciale e diversa dagli altri microrganismi (eccezione fatta per quelli della lebbra), e sia specialmente perchè la loro ricerca negli sputi interessa molto per la diagnosi e forse anche per la cura della malattia. Difatti il metodo curativo proposto da Koch per la tubercolosi polmonare può, secondo il suo inventore, dare buoni risultati solamente se applicato in principio della malattia, in un periodo, cioè, in cui soltanto la dimostrazione dei bacilli nello sputo serve a stabilire con certezza la diagnosi di tubercolosi.

Sia nello sputo, come nello interno dei tessuti, la colorazione di questi bacilli è essenzialmente la stessa; il processo di preparazione è però diverso nell'un caso e nell'altro, poichè pei preparati

(1) Ernst, *Ueber Kern-und Sporenbildung*. Zeitschr. f. Hygiene. Vol. V. 1889, p. 423.

(2) Babes, *Ueber isolit-färbbare Antheile von Bacterien*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. V. p. 173.

di sputo, esistono alcuni particolari di tecnica, oltre quelli della colorazione, molto importanti per l'esito della ricerca.

Facciamo quindi precedere ai metodi di colorazione la parte che riguarda le manipolazioni preliminari dello sputo, affinchè chi legge trovi riunito insieme tutto quanto riguarda la ricerca dei bacilli in questo materiale patologico.

Bisogna prendere anzitutto per l' esame lo sputo del mattino, il quale, accumulatosi nei bronchi durante il riposo della notte, viene espulso in abbondanza dopo il risveglio. Di questo sputo si scelgono le parti più dense, che spiccano sul resto pel colorito grigio-verdastro e per la forma loro rotondeggiante a mo' di lenticchia; e per facilitare questa scelta si versa lo sputo in un piatto nero, oppure in un largo vetro da orologio, posto su carta scura. Si prende colle pinze, o coll'ago di platino, un pezzetto di questi accumuli grigio-verdastri, e lo si schiaccia in mezzo a due coproggetti fra il pollice e l'indice, in modo che, distaccando poscia i due vetrini in senso orizzontale, resti aderente a ciascuno di essi uno strato sottile di sputo.

Questo semplice modo di preparazione dello sputo vale per tutti quei casi (e nella pratica comune sono i più numerosi) in cui il processo tubercolare dei polmoni è piuttosto esteso e i bacilli si trovano per ciò in gran copia e uniformemente sparsi nello escreato. In certi casi però la ripartizione dei bacilli nelle diverse parti dello sputo può essere molto diversa; giacchè quella parte che proviene dal tessuto polmonare affetto da semplice infiammazione catarrale, non contiene affatto bacilli. È per ciò che ogni volta che si ha il sospetto di tubercolosi, e l'esame dello sputo, preparato sui vetrini nella maniera anzidetta, ha dato risultati negativi, come pure quando si tratta di fare la diagnosi della malattia al suo stadio iniziale, è necessario ricorrere all'espediente di rendere omogeneo l'escreato e farlo sedimentare, in modo che i bacilli possano facilmente essere messi in evidenza nei preparati fatti col sedimento, dove quelli si trovano raccolti. Questo mezzo serve egualmente quando si voglia determinare la quantità dei bacilli contenuti nello sputo, e può anche in ogni caso servire per agevolare la distensione dello sputo sul vetrino.

A tale scopo Biedert (1) ha proposto di far bollire lo sputo con una soluzione tenue di soda, fino a che si è reso omogeneo, e di lasciarlo sedimentare per 2 o 3 giorni. Questo metodo però ha l'inconveniente di richiedere un tempo assai lungo e di alterare la colorabilità dei bacilli, se la proporzione dell' alcali supera una certa misura.

(1) Biedert, *Ein Verfahren den Nachweis vereinzelter Tuberkelbacillen zu sichern*, ecc , Berl. Klin. Voch. 1886, N.° 42 e 43; Ibid 1887, N.° 2.

Un altro metodo che conserva meglio i bacilli è quello suggerito da Stroschein (1), che consiste nel mettere in un recipiente cilindrico di vetro, munito di tappo, 5-10 cc. di sputo e nell'aggiungervi un volume eguale, o 2-3 volte maggiore (secondo la consistenza dello sputo), di una soluzione satura di borace e acido borico (2), mescolata con acqua nella proporzione di 1 a 3. Si chiude e si agita fortemente per circa un minuto finchè non si vedono più fiocchi nel liquido. Si versa allora in un bicchiere a calice, si lascia a sè per 24-48 ore, si decanta il liquido chiaro soprastante, e col sedimento si fanno preparati, distendendolo coll'ansa di platino sui coproggetti.

La soluzione borica impedisce la moltiplicazione dei bacilli tubercolari e di qualsiasi altro microrganismo. Quando però si tratta di contenuto di caverne polmonari, molto denso, si può, invece di quella soluzione, usarne con vantaggio un'altra di carbonato d'ammonio (Kühne).

Anche il metodo di Stroschein ha però, come quello di Biedert, l'inconveniente di esigere troppo tempo. L'uno e l'altro di questi metodi vengono perciò completati, con molto vantaggio, dalla centrifugazione (3) del liquido, nel quale si vogliono ricercare i bacilli tubercolari, sia questo orina o pus, sia sputo disciolto nella soluzione borica o in quella di soda. Si divide il liquido in un certo numero di tubi da saggio, e si sottopongono questi all'azione della forza centrifuga. In tal modo viene grandemente agevolato il raccogliersi dei bacilli nella parte inferiore del liquido che li contiene; cosicchè sottoponendo questa all'esame microscopico, per mezzo dei processi speciali di colorazione, si riesce facilmente a constatare la presenza dei bacilli, anche se questi sono in picciol numero.

Havvi pure un altro metodo, che merita di essere menzionato per la sua semplicità, mentre ha quasi gli stessi vantaggi di quelli ora esposti. Esso è proposto da Dahmen (4), e consiste nel mettere qualche nummulo di sputo denso entro un tubo da saggio e farlo cuocere senz'altro per $^1/_4$ d'ora a bagno maria, o nel vapor d'acqua a 100° C., perchè si coagulino le sostanze albuminose. Dopo la cottura, si agita bene il liquido, per distaccare dalle pareti del vetro i coaguli che vi sono aderenti, e si lascia depositare. Si decanta allora la parte liquida, e il precipitato di sostanze albuminoidi, le quali trascinano seco i bacilli tubercolari, si pesta e si rimescola bene in un mortaio, prima di farne preparati, per ottenere in esso la distribuzione uniforme dei bacilli. Con tal mezzo è possibile anche paragonare il contenuto bacillare degli sputi nei diversi stadi della malattia.

Comunque sia trattato lo sputo, una volta disteso in istrato sottile sul vetrino coproggetti (oppure sul portoggetti, per potere esaminare una maggiore quantità di materiale e fare parecchi preparati nello stesso tempo), lo straterello disteso *dev' essere lasciato disseccare all'aria* e non sulla fiamma, per evitare la precipita-

(1) V. Riassunto del lavoro nello « Jahresbericht » di Baumgarten, 1889, p. 307.

(2) La soluzione di borace e di acido borico si prepara sciogliendo prima nell'acqua calda 8 % di borace, aggiungendovi 12 % di acido borico e poscia ancora 4 % di borace. Si lascia raffreddare e si filtra.

(3) Litten, *Die Centrifuge im Dienste der klinischen Medicin*, Deutsche med. Wochenschr. 1891, N.° 23.

Krönig, *Eine Vereinfachung und Abhürzung des Biedert'schen Verfahrens*, ecc. Berl. klin. Wochenschr. N° 29. 1891.

(4) Dahmen, *Neues Verfahren Zur Auffindung der Tuberkelbacillen im Sputum*, Münch. med. Woch. N.° 38, 1891.

zione di granuli albuminosi, e finalmente fissato tenendo i vetrini in una stufa ad aria secca per 2-10 minuti a 120° C. (specialmente se si tratta di portoggetti), oppure facendoli passare per tre volte attraverso la fiamma di una lampada a spirito, o a gas.

Resta ancora da colorare i preparati fissati in tal guisa.

I metodi di colorazione dei bacilli tubercolari sono assai numerosi, ma si può dire che uno solo è fondamentale, quello di Koch-Ehrlich, giacchè gli altri non sono che varianti di questo metodo. Si è già detto in principio che i bacilli tubercolari si comportano verso i colori d'anilina in una maniera particolare e diversa dagli altri microrganismi; questa particolarità consiste in ciò che essi si colorano assai difficilmente e quindi lentamente, e resistono più degli altri all'azione decolorante dei mezzi più attivi, quali sono gli acidi minerali (nitrico, cloridrico e solforico) concentrati.

Su questi dati è basato appunto il metodo classico di colorazione, che è detto di Koch-Ehrlich, perchè quest'ultimo autore ha introdotto nel metodo primo trovato da Koch (1) la modificazione essenziale della decolorazione cogli acidi concentrati, mentre poi lo stesso Koch, accettando la modificazione di Ehrlich, ha, a sua volta, leggermente variato l'intiero processo di colorazione.

I principî fondamentali del metodo sono: colorare i preparati, sia quelli sui coproggetti come le sezioni, in una soluzione Ehrlich di azzurro di metilene, di fucsina, di violetto di genziana, di violetto di metile, per 12-24 ore a freddo, o per pochi minuti (1-5) a caldo; decolorarli in una soluzione concentrata di acido nitrico, cloridrico, o solforico, e colorare successivamente le parti del preparato decolorate dall'acido con una tinta di contrasto, bruna se il colore primitivo era azzurro o violetto, e verde od azzurra se il primo colore era rosso.

I particolari del metodo sono i seguenti:

1.° Il preparato fissato sul coproggetti si copre colla soluzione colorante, oppure si immerge nella stessa entro un vetrino da orologio. Nel primo caso, se si vuol colorare a freddo, lo si copre e si lascia stare 12-24 ore, e se si vuole affrettarne la colorazione, come è più comodo per la pratica comune, si riscalda sopra una fiamma per 1-2 minuti, e si lascia a sè per altri 5-10. Se però si immerge il preparato nella soluzione colorante contenuta in un vetrino da orologio (e ciò torna comodo per poter fare contemporaneamente pa-

(1) Il metodo primitivo di Koch, che consiste nel colorare dapprima i preparati colla soluzione alcalina debole di azzurro di metilene e nel colorare poscia successivamente colla vesuvina, che scaccia il colore primitivo da tutti gli elementi del preparato, comprese le altre forme accidentali di microrganismi, non ha ormai che un valore storico e non fa quindi mestieri di esporlo con maggiori particolari.

recchi preparati) non è prudenza riscaldare direttamente sulla fiamma il vetro da orologio, ma val meglio, per evitare che si rompa, porlo sopra una rete metallica in un sostegno, e riscaldarlo da sotto con una piccola fiamma.

Se si tratta di sezioni, è sempre da consigliarsi di lasciarle colorare a freddo per 12-24 ore, per evitare che il calore ne alteri la struttura.

Delle sostanze coloranti la fucsina è quella che dà le immagini più brillanti e più spiccate, ed anche una colorazione più duratura; l'azzurro di metilene colora bene e durevolmente i bacilli, ma li fa apparire più sottili. La colorazione col violetto di genziana o di metile spesse fiate rapidamente svanisce.

2.° Dalla soluzione colorante i preparati si passano direttamente nell'acqua con acido nitrico al 20-25 %, dove si tengono pochi secondi;

3.° si lavano nell'alcool al 60 % per alcuni minuti, e da questo si passano

4.° nella soluzione colorante di contrasto, che sarà l'azzurro di metilene in soluzione acquosa o idralcoolica (non la soluzione Löffler che può colorare anche i bacilli tubercolari), oppure il verde di metile se il primo colore adoperato è la fucsina, e sarà invece la vesuvina se si adoperò il violetto di genziana o quello di metile, oppure l'azzurro di metilene. In questa soluzione si tengono i preparati per 1-2 minuti e poscia

5.° si lavano nuovamente nell'alcool al 60 %; finalmente, se si tratta di coproggetti, si osservano al microscopio ponendoli in una goccia d'acqua deposta sul portoggetti, oppure si disseccano e si chiudono nel balsamo.

Se si tratta di sezioni invece

6.° si disidratano nell'alcool assoluto;

7.° si rischiarano coll'olio di bergamotto, o col xilolo, e finalmente

8.° si chiudono nel balsamo.

Delle molteplici modificazioni proposte a tal metodo esporremo soltanto quelle che realizzano un qualche vantaggio positivo, sia per la pratica, abbreviando il tempo dell'operazione, sia per la conservazione migliore e più duratura dei preparati, e sia finalmente per la colorazione di un numero maggiore di bacilli.

a) *Metodo di Fränkel.* Una modificazione importante per la pratica è quella di Fränkel (1), la quale abbrevia di molto l'in-

(1) Fränkel, *Ueber die Färbung des Koch'schen Bacillus*, Berl. klin. Wochenschrift, 1884, N.° 13.

tiero processo, e serve quindi specialmente per la colorazione degli sputi. Essa consiste nel colorare dapprima rapidamente i preparati nella soluzione Ziehl di fucsina, riscaldata, e nel compiere in un sol tempo la decolorazione e la colorazione di contrasto, immergendoli in un miscuglio composto da

50 di acqua
30 « alcool
20 « acido nitrico

a cui si aggiunge la soluzione alcoolica satura di azzurro di metilene fino a saturazione.

In questo miscuglio si tengono i preparati finchè hanno preso una tinta azzurra, e poscia si lavano nell'acqua e si trattano come al solito. In 4 minuti la colorazione è compiuta, e i bacilli appaiono tinti in rosso su fondo azzurro.

Gabbet (1) ha introdotto in questo metodo di Fränkel una insignificante modificazione, usando una miscela composta di

100 parti di soluzione acquosa di acido solforico al 25 %.
1-2 parti di azzurro di metilene.

La sostituzione dell'acido solforico a quello nitrico avrebbe il vantaggio di rendere più duratura la colorazione.

Un altro metodo che citiamo perchè molto in uso, ma che non offre speciali vantaggi su quello di Kock-Ehrlich, è quello di Ziehl-Neelsen (2), che consiste nel colorare colla soluzione Ziehl di fucsina riscaldata, lavare con acqua, decolorare nella soluzione d'acido solforico al 5 %, lavare nell'alcool al 60 %, lavare di nuovo nell'acqua, fare la colorazione di contrasto coll' azzuro di metilene o col verde di malachite, lavare nell'acqua e finalmente osservare, o chiudere nel balsamo, come di solito.

Un metodo che offre invece qualche vantaggio, specialmente per la conservazione dei preparati, è il

b) *metodo di Günther* (3), che esponiamo perciò in tutti i suoi i particolari.

1.° I preparati sui coprogetti si colorano nella soluzione Ehrlich di fucsina, riscaldata fino allo svolgimento visibile dei vapori, lasciandoveli ancora immersi 1 minuto.

2.° Si immerge il vetrino, tenuto colle pinzette colla faccia su cui è il preparato volta all'insù, nell'alcool acidificato con HCl al 3 % e vi si tiene per 1 minuto, movendolo continuamente.

3.° Si lava il preparato abbondantemente con un getto d'acqua.

(1) Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie, Vol. V, 1888, p. 106.
(2) Fortschr. d. Medicin, 1885, N.° 7, p. 200.
(3) Opera citata, p. 166.

4.° Vi si depongono alcune goccie di soluzione acquosa o idralcoolica di azzurro di metilene, fino ad ottenere una colorazione azzurra non molto intensa, perchè non copra l'immagine dei bacilli tinti in rosso.

5.° Si lava con acqua.

6.° Si asciuga il vetrino con un panno dalla parte dove non è il preparato, e si dissecca dall'altra parte soffiandovi l'aria con un soffiatore a mano.

7.° Si fa passare il preparato per 3 volte sulla fiamma come pel fissamento, e finalmente:

8.° Si chiude nel balsamo sciolto nel xilolo. Il momento più importante e speciale dell'operazione è il penultimo (1), giacchè il riscaldamento scaccia qualsiasi residuo di acido dal preparato e fa sì che questo si conservi lungamente.

La stessa avvertenza vale specialmente allorquando si devono colorare i bacilli tubercolari nelle sezioni, dove appunto è più facile che restino traccie dell'acido usato per la decolorazione, e dove per ciò, se si vogliono conservare a lungo i preparati, serve benissimo la variante di Unna del disseccamento, introdotta nel metodo Koch-Ehrlich, o in quello di Günther.

Citiamo anche il

c) *metodo di Czaplewski* (1), il quale ha di mira di porre in evidenza il maggior numero possibile di bacilli, cercando in pari tempo di evitare che alcuno di essi dopo essere stato colorato scompaia per opera della successiva decolorazione.

Secondo questo metodo:

1.° Il preparato sul coproggetti si colora colla soluzione Ziehl di fucsina, riscaldandolo direttamente sulla fiamma e badando che resti sempre coperto dalla soluzione.

2.° Si fa sgocciolare dal preparato la soluzione colorante e si immerge, senza lavarlo, per 6-10 volte consecutive in una soluzione alcoolica satura di fluoresceina gialla, a cui si è aggiunto azzurro di metilene in polvere fino a saturazione. Il vetrino si estrae ogni volta dalla soluzione colla faccia che ha il preparato rivolta all'insù, lasciandone sgocciolare lentamente il liquido che lo ricopre, e ripetendo, come si è detto, l'operazione per 6-10 volte.

3.° La stessa operazione si ripete per 10-12 volte in una soluzione alcoolica satura di azzurro di metilene.

4.° Si lava con acqua rapidamente e si osserva, oppure si chiude nel balsamo come al solito.

(1) Czaplewski, *Zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Sputum*, Centralbl. f. Bakteriologie, Vol. VIII, 1890, p. 685 e 717.

Con questo metodo tutti i bacilli colorati in rosso colla fucsina mantengono inalterata la primitiva colorazione, i preparati si conservano a lungo, e l'intiero processo non dura più di 2-3 minuti.

Anche Kühne (1) ha proposto per lo stesso scopo, per evitare, cioè, che la colorazione successiva coll'azzurro di metilene scacci il color rosso da alcuni bacilli tubercolari, di decolorare semplicemente coll'acido nitrico o coll'acido solforico al 30 % il preparato colorato a freddo per 5 minuti nella fucsina Ziehl, e dopo averlo lavato con acqua e disseccato, osservarlo al microscopio in una goccia di olio d'anilina, tinto leggermente in giallo con acido picrico (2-3 goccie di soluzione satura di ac. picrico nell'olio d'anilina, aggiunte all'olio d'anilina puro in un vetro da orologio). Invece dell'acido picrico si può anche usare un altro colore di contrasto, verde di malachite o azzurro di metilene, sciolti egualmente nell'olio d'anilina.

Se si toglie l'olio d'anilina, restano colorati nel preparato i soli bacilli tubercolari (in rosso). Quando il preparato si vuol conservare, si colora in una soluzione acquosa d'acido picrico, si dissecca e si chiude nel balsamo.

Con questo metodo i bacilli si vedono molto chiaramente, ma le altre parti del preparato non restano colorate. Oltre a ciò, secondo Eberth, la decolorazione coll'acido nitrico al 30 % sarebbe troppo energica, producendo alterazioni nella forma dei bacilli.

d) Merita finalmente di essere menzionata per la sua semplicità la modificazione proposta da Kaufmann (2), la quale consiste nel lavare i preparati di sputo sui coproggetti, colorati a caldo colla soluzione Ziehl di fucsina, nell'acqua bollente (98-99°C) per 1-3 minuti, finchè il preparato, messo sul portoggetti, conserva un colore debolmente roseo. L'acqua bollente agisce come gli acidi minerali, ossia lascia colorati i bacilli tubercolari solamente, decolorando tutto il resto. Questa modificazione, che non può applicarsi per le sezioni, riesce utile specialmente pel medico pratico, perchè è la più semplice di tutte per l'esame degli sputi.

I bacilli tubercolari si colorano bene anche col metodo di Gram; ma questo metodo, oltrechè non può servire, come quello Koch-Ehrlich, di criterio diagnostico per tali bacilli, ha pure l'inconveniente di farli apparire come catenelle di micrococchi, il che può indurre in errore chi è poco pratico di simili osservazioni.

Nella colorazione adunque si ha un mezzo facile e sicuro per distinguere da tutti gli altri i bacilli tubercolari, giacchè nessun altro microrganismo, eccettuati i bacilli della lebbra, resta colorato col metodo speciale trovato da Ehrlich e da Koch, e quando

(1) Kühne, *Die Untersuchung von Sputum auf Tuberkelbacillen*, Centralbl. f. Bakter. Vol. VIII, 1890, p. 293.

(2) Kaufmann, *Ein einfaches Verfahren zum Nachweis der Tuberkelbacillen im Auswurf*. Centralblatt f. Bacteriologie Vol. XII, 1892, pag. 142.

esista la possibilità di uno scambio con questi ultimi, esistono anche per questi alcune differenze nel modo di comportarsi di fronte alle sostanze coloranti, che ne permettono stabilire il diagnostico differenziale.

Non è però da credersi che il metodo Koch-Ehrlich sia assolutamente *specifico* dei bacilli tubercolari, come si ritenne in principio, affermando che questi non sono suscettibili di colorarsi colle soluzioni acquose o idralcooliche semplici. Baumgarten (1) ha invece dimostrato che si può benissimo anche con queste soluzioni ottenere colorati i bacilli tubercolari, ed anche differenziarli dagli altri microrganismi, mediante la colorazione doppia del preparato.

I metodi di colorazione proposti da Baumgarten, nei quali non entra la decolorazione cogli acidi concentrati, possono però servire soltanto quando si voglia, oltre i bacilli, studiare certe particolarità istologiche delicate dei tessuti, ad es. la cariocinesi, oppure quando si vuole ricercare se insieme coi bacilli tubercolari esiste qualche altra specie di microrganismi. Quando invece si tratta di stabilire un diagnostico differenziale *esatto e sicuro*, non havvi alcun metodo che possa sostituire quello fondamentale di Koch-Ehrlich, il quale sotto questo punto di vista ha realmente il valore di una reazione chimica speciale, se non specifica, dei bacilli tubercolari.

Della colorazione di questi bacilli nelle sezioni dei tessuti non v'è più luogo a parlare, giacchè, salvo alcune piccole particolarità già esposte, si applicano egualmente i metodi sopradescritti. Ripeterò soltanto che per queste non si deve accelerare di troppo la colorazione mediante il riscaldamento, come pei preparati di sputo, perchè non resti alterata la struttura istologica del tessuto. Se però non si vuole aspettare le 12-24 ore, si può tenere una via di mezzo, ponendo il vetrino da orologio colla sostanza colorante e colle sezioni entro il termostato a 37° C. Secondo anche la mia esperienza, è già sufficiente mezz'ora di permanenza a 37° C. per ottenere colla soluzione di fucsina, alla Ehrlich o alla Ziehl, distintissima la colorazione dei bacilli tubercolari nei tessuti. Questi devono essere induriti coll'alcool, piuttosto che coll'acido cromico od osmico, poichè questi ultimi rendono difficile ed incompleta la colorazione dei bacilli.

e) Colorazione del bacillo della lebbra.

I bacilli della lebbra, i quali hanno un aspetto molto simile a quelli tubercolari e si colorano egualmente col metodo Koch-Ehr-

(1) Baumgarten, *Beiträge zur Darstellungsmethode der Tuberkelbacillen*, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie, Vol. I, 1884, p. 52.

lich, se ne distinguono tuttavia anche per alcune particolarità di colorazione.

Koch dapprincipio avea detto che il bacillo della lebbra si distingue da quello della tubercolosi per ciò, che esso si colora anche colle soluzioni acquose o idralcooliche, mentre quello tubercolare si colora soltanto col metodo speciale da lui scoperto. Per quanto ciò non sia completamente esatto, come ha dimostrato Baumgarten, tuttavia si può, col metodo da questi (1) proposto, differenziare facilmente le due specie di bacilli, valendosi del fatto che quelli della lebbra si colorano più facilmente e in minor tempo che quelli tubercolari.

Il metodo differenziale di Baumgarten consiste nel tenere i preparati a contatto con una soluzione idralcoolica di fucsina per 6-7 minuti, se si tratta di preparati sui coproggetti, e per 12-15 minuti se di sezioni, nel decolorarli per $^1/_4$-$^1/_2$ (sezioni) minuto in un miscuglio di alcool e di acido nitrico (1 : 10), lavarli con acqua, immergerli in una soluzione acquosa di azzurro di metilene, lavarli di nuovo e rischiararli con olio di bergamotto.

I bacilli della lebbra appaiono colorati in rosso su fondo azzurro, mentre quelli tubercolari nello stesso tempo e con eguale trattamento non restano colorati.

Secondo le mie osservazioni, posso dare come metodo differenziale anche la colorazione coll'azzurro di metilene, giacchè questa sostanza colorante, mentre colora bene i bacilli della tubercolosi, non colora che poco o nulla quelli della lebbra, anche se usata in soluzione alcalina e fatta agire 24 ore. Neisser ha pure constatato lo stesso fatto, e Kühne afferma che anche col suo metodo i bacilli lebbrosi non si colorano che in parte e debolmente.

Quando non si tratta di fare la diagnosi differenziale, il miglior metodo per la colorazione delle sezioni di tessuto lebbroso è quello Koch-Ehrlich alla fucsina, limitando la durata dell'immersione nella soluzione colorante a $^1/_2$-1 ora, e colorando successivamente colla soluzione acquosa di azzurro di metilene. Così colorate le sezioni, meglio che disidratarle nell'alcool, vale disseccarle sul coproggetti col metodo Unna: in tal modo i bacilli spiccano assai bene, e si conserva a lungo la loro colorazione.

f). Colorazione dei bacilli del moccio e del tifo addominale.

Il bacillo del moccio è facilmente colorabile, ma la sua colorazione resiste poco all'azione dei mezzi decoloranti, per cui riesce

(1) Baumgarten, *Ueber Untersuchungsmethoden zur Unterscheidung von Lepra-und Tuberkel-Bacillen*, Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie, Vol. I, 1884, p. 367

piuttosto difficile dimostrarne la presenza nei tessuti malati, giacchè non resiste al metodo di Gram, e non si può usare per esso la doppia colorazione.

Se si tratta di preparati sui coproggetti, si adopera la soluzione Ehrlich di genziana o di fucsina, oppure la soluzione Kühne di azzurro di metilene; i preparati, tenuti a contatto per 5 minuti colla soluzione colorante, si lavano con acqua debolmente acidulata con acido cloridrico (10 goccie su 500 cc. d'acqua) e si trattano poscia come al solito.

Per le sezioni Löffler ha proposto i metodi seguenti:

A) 1.° Colorazione nella soluzione Löffler di azzurro di metilene per 5 minuti.

2.° Decolorazione per 5 secondi in una miscela composta di 10 parti di acqua, 2 goccie di acido solforoso concentrato, 1 goccia di soluzione d'acido ossalico al 5%.

Le sezioni si disidratano poscia coll'alcool, si rischiarano e si chiudono nel balsamo. I bacilli conservano un colorito azzurro scuro, mentre il resto del preparato, compresi i nuclei, presenta una tinta azzurra molto più chiara.

B) 1.° Colorazione nella soluzione Ehrlich di genziana o di fucsina per 5 minuti.

2.° Decolorazione nella soluzione di acido acetico 1%, a cui si è aggiunta una soluzione acquosa di tropeolina 00 fino a colorazione giallo-vinosa, e trattamento successivo come sopra.

Nanievicz (1) ha modificato quest'ultimo metodo, combinandolo con quello di Unna del disseccamento, ed ottenendone, secondo lui, risultati assai migliori. Questo metodo modificato consta dei seguenti momenti:

I.° Colorazione per 5 minuti nella soluzione Löffler di azzurro di metilene.

2.° Lavamento con acqua, e successiva decolorazione (per 2-4 secondi) in un miscuglio di 75 parti di soluzione acetica a $^1/_2$ % e 25 parti di soluzione acquosa di tropeolina 00 a $^1/_2$ %.

3.° Lavamento nell'acqua.

4.° Disseccamento sul portoggetti col metodo Unna.

5.° Rischiaramento con xilolo, ecc.

Anche il metodo generale di Kühne (2), specialmente se combinato con quello di Weigert coll'olio d'anilina, o con quello di Unna del disseccamento, serve bene egualmente per la colorazione

(1) Deutsche Zeitschr. f. Thiermed, u. vergl. Pathologie, Vol. XVII, p. 1196.

(2) Kühne consiglia pure di privare di alcool la sezione, mettendola nell'acqua, prima di porla a contatto della soluzione colorante.

del bacillo del moccio nei tessuti: sicchè in sostanza si può dire che servono bene quei metodi nei quali si usano, invece dell'alcool, altri mezzi disidratanti, i quali non esercitano in pari tempo un'azione decolorante sui bacilli. —

Ciò che ora si è detto pel bacillo della morva, vale egualmente per quello del tifo addominale: anche questo infatti resiste poco all'azione dei mezzi decoloranti, non si colora col metodo Gram, nè si può ad esso nei tessuti applicare la doppia colorazione. Nei preparati sui coproggetti si colora bene coi metodi ordinarî, specialmente se si adoperano le soluzioni di Ehrlich, di Löffler, o di Kühne.

Per colorarlo nelle sezioni, si tengono queste per 24 ore nella soluzione Löffler di azzurro di metilene, o nella soluzione Ziehl di fucsina, si lavano poscia semplicemente nell'acqua, si disidratano coll'olio di anilina, si rischiarano col xilolo e si chiudono nel balsamo.

Il metodo generale di Kühne serve anch'esso assai bene per la colorazione di questo bacillo nei tessuti.

g). Colorazione dei bacilli della sifilide (Lustgarten) e di altri microrganismi.

Il processo di colorazione col quale Lustgarten (1) ha colorato nel secreto e nelle sezioni di neoformazioni sifilitiche una forma di bacillo, da lui ritenuto specifico della malattia, è stato annunziato come un metodo di colorazione speciale e proprio di questo suo « bacillo della sifilide », come quello di Koch-Ehrlich pel bacillo tubercolare. Un tal metodo consiste nel tenere a contatto le sezioni, o i preparati sui coproggetti, per 24 ore nella soluzione Ehrlich di genziana, nel lavarli nell'alcool se si tratta di sezioni, e nell'acqua se di coproggetti, e nell'immergerli poscia per pochi secondi in una soluzione di permanganato di potassa a 1 $^1/_2$ $^0/_0$, che decolora il tessuto, lasciando colorati i bacilli. Dalla soluzione di permanganato i preparati si passano in una soluzione acquosa di acido solforoso puro, dove si discioglie il precipitato precedentemente prodotto di perossido di manganese, e il preparato appare non più di colore scuro, ma quasi bianco. Se invece si mantiene ancora colorato, si ripete più volte l'immersione nel permanganato e nell'acido solforoso, fino a decolorazione completa.

I bacilli sono entro le cellule, e in generale molto scarsi.

Lungi però dall' essere specifico di questi bacilli, il metodo

(1) Wiener medic. Jahrbücher, 1885.

di colorazione suesposto, come hanno trovato Alvarez e Tavel (1) e Matterstock (2), è comune anche ad altri batterì molto simili di forma a quelli di Lustgarten, i quali si trovano nel secreto del prepuzio, della vulva e dell'ano nelle persone normali, e che sono detti perciò « bacilli dello smegma ».

Il metodo primitivo di Lustgarten è stato semplificato da De Giacomi e da Gottstein (3), adoperando per la decolorazione il percloruro di ferro. Secondo questo processo, i preparati colorati nella fucsina Ehrlich per qualche minuto a caldo, se sui coproggetti, e 24 ore a freddo se sezioni, si lavano nell'acqua a cui si sono aggiunte poche goccie di percloruro di ferro, si decolorano nella soluzione concentrata della stessa sostanza e si lavano abbondantemente con acqua o con alcool, a seconda che sono preparati sui coproggetti, oppure sezioni. I bacilli restano colorati in rosso, e tutto il resto si decolora.

Accenniamo appena a questi metodi di colorazione, giacchè per quanto Doutrelepont e Schütz (4) abbiano confermato le osservazioni di Lustgarten ed abbiano anzi trovato i bacilli anche nel sangue dei sifilitici, tuttavia, specialmente pel fatto che nel secreto normale degli organi genitali trovansi bacilli simili per forma e per reazione colorante, i quali possono secondariamente penetrare nei tessuti malati (come si è verificato ad es. pel cancro), è ancora molto dubbio che i bacilli osservati da Lustgarten sieno veramente specifici della sifilide. Rimarrebbe in appoggio soltanto il fatto della presenza di essi nelle neoformazioni sifilitiche di organi profondi, ma anche in questi casi i bacilli che si trovano sono troppo scarsi, per essere messi in rapporto sufficiente colle alterazioni patologiche: d'altronde è già passato qualche anno dalla scoperta di Lustgarten, senza che si sia fatto alcun passo in avanti nella questione, e senza che neppure si sia mai riuscito a coltivare quei bacilli.

Oltre a quelli finora nominati, vi sono anche altri micropa-rassiti, pei quali, se non fa d'uopo ricorrere a metodi speciali per colorarli, è pur necessario esporre le particolarità di colorazione che sono più adatte per metterli bene in evidenza nei tessuti, o nei succhi dell'organismo animale.

Così il micrococco della gonorrea, o *gonococco* di Neisser, si colora bene specialmente coll'azzurro di metilene alcalino o sciolto nell'acqua fenica, e si può anche metterlo meglio in evidenza colla doppia colorazione. A tale scopo Fränkel (5) consiglia il metodo seguente:

(1) Archives de physiol. norm. et path., 1885, N.° 7.
(2) Verhandlungen d. Würzb. phys. med. Gesellschaft, Juin 1885.
(3) Fortschritte d. Medicin, N.° 16, 1885.
(4) Deutsche medicinische Wochenschr., 1885.
(5) Opera citata, p. 443.

I preparati di pus gonorroico, fissati col calore sui coproggetti, si coprono di una soluzione alcoolica cencentrata di eosina, che si fa riscaldare come di solito sulla fiamma, lasciandola per qualche minuto a contatto del preparato. Si asciuga il preparato con carta bibula senza lavarlo, si immerge per breve tempo (15 secondi) in una soluzione alcoolica concentrata di azzurro di metilene e si lava con acqua. I gonococchi appaiono colorati in azzurro su fondo rosso.

Questi microrganismi non restano colorati col metodo di Gram, ed è questo un carattere che può differenziarli da altri micrococchi che si trovano nel pus, e che si scolorano col metodo Gram.

Pel *bacillo del colèra* la sostanza colorante migliore è la fucsina in forma di soluzione acquosa satura, lasciata a contatto dei preparati per 10 minuti a freddo, e per 5 minuti se fatta riscaldare sulla fiamma fino alla comparsa dei vapori visibili.

L'*actinomyces* nelle sezioni dei tessuti, sia degli animali, come dell'uomo, si colora bene colla soluzione Ehrlich di genziana, o colla soluzione Ziehl di fucsina, tenendovi immerse le sezioni per 24 ore a freddo, o per $^1/_2$-1 ora nel liquido riscaldato, e trattandole poscia per alcuni minuti colla soluzione jodo-jodurata e disidratandole coll'olio d'anilina.

Un altro metodo che raccomando per mia esperienza è quello della colorazione colla soluzione Ehrlich di safranina per 1-2 ore, e del trattamento successivo come pel metodo Gram.

Duncker (1) consiglia il metodo seguente. Si fa una soluzione satura di cocciniglia nell'alcool, e se ne mettono 10 goccie in un vetro da orologio pieno d'acqua. Si tengono le sezioni in questo liquido per 8 ore e si lavano nell'alcool; se si vuole ottenere la colorazione doppia, si tengono ancora immerse per 1-3 ore in una soluzione di ematossilina, si disidratano nell'alcool, si rischiarano coll'olio di bergamotto e si chiudono nel balsamo.

Per gli *ifomiceti* (muffe) serve bene il metodo di Gram, colla modificazione di Weigert.

Altri parassiti di ordine superiore, come le amebe, si osservano meglio allo stato fresco, con o senza colorazione, giacchè i processi che si usano per fissare i preparati da conservare ne alterano più o meno sensibilmente la forma.

I preparati di sangue contenente le amebe malariche si possono colorare colla soluzione acquosa semplice di azzurro di metilene, o meglio col metodo di Chenzinsky, quale è stato descritto da Hochsinger (2). A 100 gr. di soluzione acquosa concentrata di

(1) Zeitschr. f. Mikroskopie u. Fleischbeschau, 1884, N.° 3.
(2) Sémaine médicale 1891, p. 182.

azzurro di metilene si aggiungono poche goccie di alcool assoluto e un mezzo grammo di eosina solubile nell'acqua. Questa soluzione, sterilizzata col calore, si conserva lungamente inalterata. I preparati si tengono per 10-15 minuti in questa soluzione riscaldata, si lavano con acqua, si disseccano e si chiudono nel balsamo. I globuli rossi appaiono colorati in rosso-roseo, i nuclei dei leucociti in azzurro scuro e le amebe malariche in celeste chiaro.

I parassiti malarici si possono anche colorare, con molto vantaggio per l'osservazione dei particolari della loro struttura, allo stato fresco, giusta i precetti di Celli e Guarnieri (1), mescolando col sangue malarico, appena estratto, il siero sanguigno, o quello ascitico, colorato coll'azzurro di metilene.

Un buon mezzo per fissare e conservare le amebe libere, senza alterarne la forma, è la soluzione proposta da Brass (2), composta di:

1 parte di acido cromico.
1 » di cloruro di platino.
1 » di acido acetico concentrato.
400-1000 parti di acqua.

Si depone una goccia di questa miscela sul margine del vetrino coproggetti, e si lascia che il liquido, penetrando a poco a poco fra il coproggetti e il portoggetti, fissi gli elementi ameboidi e li conservi.

Per l'indurimento dei tessuti contenenti amebe, lo stesso Brass consiglia una soluzione di acido cromico a $^1/_8$-$^1/_2$ %, nella quale si immergono i tessuti, appena estratti dall'animale. Dopo poco tempo, vi si aggiungono ancora poche goccie di soluzione concentrata di acido cromico, e quando sia operato il fissamento, si lavano i pezzi nell'alcool al 30 %, si passano da questo in alcool sempre più concentrato, e finalmente nell' alcool assoluto. La colorazione delle sezioni si fa poi coll'ematossilina e coll'azzurro di metilene. Anche la miscela che serve per le amebe libere può però servire per l'indurimento dei tessuti colle amebe.

h) Colorazione dei microfiti cutanei.

Come appendice ai metodi di colorazione speciali esponiamo i processi messi in uso da Bizzozero (3) per lo studio dei microrga-

(1) Celli e Guarnieri, *Ueber die Aetiologie der Malariainfection*, Fortschritte d. Medicin, 1889, N.° 14-15.

(2) Brass, *Die Methoden bei der Untersuchung thierischen Zelle*, Zeitschr. f. wiss. Mikrosk, pag. 39, 1884.

(3) Bizzozero, *Sui microfiti della epidermide umana normale*. Estratto dal volume pubblicato pel giubileo dottorale del Sen. Sperino, Torino 1884.

nismi della pelle normale, giacchè essi servono ugualmente anche per la ricerca dei microparassiti cutanei.

Siccome la difficoltà principale per la colorazione dei prodotti epidermici si ha nella presenza del grasso, così conviene anzitutto eliminarlo, specialmente quando si tratta di esaminare la forfora. Quindi i peli o le squamette epidermiche si pongono anzitutto nell'alcool assoluto, vi si lasciano qualche ora, si mettono nell'etere, e dopo 1-2 giorni di nuovo nell'alcool assoluto, ove si conservano indefinitamente pronti sempre per essere esaminati.

Bizzozero ha indicato tre metodi, che servono di complemento l'uno dell'altro per la dimostrazione dei singoli microfiti.

Nel 1.° si mette in opera l'azione dei reattivi dissolventi, acido acetico e potassa caustica. L'acido acetico si usa in soluzione concentrata (50 %), e la potassa in soluzione del 10 %. Si pongono le squamette, digrassate come sopra, in una goccia di queste soluzioni sul coproggetti, si disgregano delicatamente cogli aghi se sono ammassate, e, quando l'azione del reagente che si adopera le ha rigonfiate a sufficienza, si coprono con un vetrino e si osservano. Le cellule appaiono rigonfie e semi-trasparenti, mentre i microbi si vedono coi loro contorni scuri e ben definiti. Volendo conservare i preparati fatti coll'acido acetico, non si ha che da porre sui bordi del vetrino una goccia di glicerina fenica, la quale va a sostituire l'acido e mantiene la preparazione.

Gli altri due metodi si giovano dei reattivi coloranti ordinari, e specialmente dell'azzurro di metilene, col quale si ottiene una colorazione limitata quasi esclusivamente ai microfiti. Si può semplicemente porre le squamette od i peli in una goccia di glicerina leggermente tinta con quella sostanza, rimuoverli coll'ago perchè vengano bene con essa a contatto, e dopo 10-15 minuti esaminarli come sopra. Oppure le squame digrassate si fanno rigonfiare nell'acido acetico al 50 % (per un $^1/_4$ d'ora, o poco più), si distendono sul portoggetti, e dopo aver fatto evaporare l'acido a moderato calore si fissano, passando il preparato per 3 volte attraverso la fiamma; vi si depongono sopra alcune goccie della soluzione colorante per un tempo variabile da pochi minuti a mezz'ora, si lavano poscia con acqua, si fanno essiccare e si chiudono nel balsamo.

L'azzurro di metilene è il più adatto di tutti, anche per la colorazione dei microparassiti della pelle (*Achorion Schönleini*, *Tricophyton tonsurans*), specialmente sotto forma di soluzione di Löffler.

i) Valore ed importanza della colorazione.

Se l'applicazione dei colori d'anilina e dell'apparecchio d'illuminazione di Abbe alla tecnica dei microrganismi ha facilitato assai lo studio di questi, non per questo si può dire che sieno state rimosse tutte le difficoltà e le cause di errore inerenti ad un tal genere di ricerche. È necessaria una lunga esperienza per poter superare certe difficoltà, e per riconoscere ed evitare alcune sorgenti d'errore inerenti alla colorazione dei microrganismi.

Si possono distinguere tre specie di errori possibili: *a*) si possono scambiare con microrganismi altri elementi che non lo sono; *b*) si può giudicare della presenza di microparassiti là dove invece non si tratta che di mera accidentalità (germi provenienti dall'esterno, o dovuti alla putrefazione); *c*) finalmente dal risultato negativo della colorazione si può talora erroneamente escludere la presenza dei microbi nei tessuti.

Quanto alla prima causa d'errore, può lo scambio avvenire anzitutto coi *detritus granulari*, ossia con quelle granulazioni che provengono dalla distruzione del nucleo, nei casi di morte cellulare locale in mezzo a tessuti in cui continua ancora la circolazione (*Coagulationsnecrose* dei Tedeschi). Codesti *detritus* si colorano intensamente colle tinte d'anilina e potrebbero essere scambiati con colonie di micrococchi. Si differenziano però facilmente pel loro volume maggiore, o per la forma irregolare, ed anche perchè non sono mai collegati in gruppi regolari o in catene, come i microrganismi cocciformi. Un altro criterio differenziale è infatti il modo di aggruppamento degli stessi, il quale ricorda, almeno in principio, la figura del nucleo primitivo. Queste differenze sono importanti a ricordarsi, giacchè il processo di cariolisi è spesso legato alla presenza di microparassiti, e si incontra soventi nelle affezioni settiche e nelle infiammazioni caseose.

Weigert ha pure osservato nei processi che decorrono con setticemia la presenza di certi granuli, specie di goccioline, che egli ritiene composte di leucina, e che si distinguono pel loro splendore dai detritus granulari, dai nuclei e dai microbi, ma si colorano anch'esse intensamente colle tinte d'anilina ed anche coll'ematossilina.

Più facile però può essere lo scambio colle granulazioni di certe cellule speciali, descritte da Ehrlich (1) col nome di *Mastzellen* o *Plasmazellen*, che si possono nel nostro idioma chiamare *cellule granulose* di Ehrlich, indicando con questo nome la carat-

(1) Archiv. für mikroskopische Anatomie, Bl. XIII, 1877, p 263.

teristica morfologica principale di esse, giacchè finora non se ne conosce il significato. Sono cellule di forma diversa, rotonda, piatta, od ovale, grandi il doppio circa delle cellule linfoidi, formate da un nucleo circondato da ammassi di granulazioni protoplasmatiche (Tavola V. Fig. 1), si trovano in grandi quantità nel tessuto connettivo, e sono specialmente numerose nelle mucose, nel tessuto sottomucoso, nel connettivo intramuscolare, nelle sierose, ecc.; stanno per lo più vicino ai vasi, o aderenti alle pareti degli stessi, e quasi sempre isolate. Aumentano poi notevolmente di numero nei processi patologici più differenti: sono abbondanti nel tessuto di granulazione che si forma lentamente, abbondano nell'elefantiasi, all'intorno dei tumori, e così via. Sono state anche trovate nel sangue leucemico; mancano però nell'uomo nel sangue normale. Koch le ha trovate numerose nel sangue, e specialmente nella milza e nei polmoni dei topi bianchi.

Tali elementi si comportano verso i colori di anilina al rovescio di tutte le altre cellule; giacchè, mentre generalmente si colorano soltanto i nuclei, nelle cellule granulose invece si colora solo il protoplasma coi suoi granuli, ed il nucleo rimane incoloro e quindi poco o nulla visibile. E siccome le granulazioni hanno press'a poco la stessa grandezza di certi micrococchi, se il nucleo non appare le cellule in discorso possono sembrare una colonia di microrganismi; se poi la cellula si è disgregata, come accade facilmente nel distendere i liquidi sui coproggetti, le granulazioni possono apparire come cocchi isolati o riuniti in gruppi.

I criterî che servono ad evitare l'errore sono la grandezza disuguale, il tono di colore speciale (rossiccio, se la colorazione si è fatta colla tinta violetta), ed il confronto con altre cellule consimili rimaste intatte, nelle quali è possibile distinguere il nucleo, facendo anche, se occorre, preparati cogli stessi liquidi o tessuti tolti da un animale sano della stessa specie, e colorati col carmino, che tinge i nuclei e non i microrganismi. Per evitare poi qualsiasi scambio, si può usare il metodo di colorazione isolata di Koch (1), che consiste, come si è detto, nel trattare le sezioni colorate colle tinte d'anilina, invece che coll'acido acetico o coll'alcool, con una soluzione diluita di carbonato di potassa, che toglie il colore a tutti gli elementi organici e non ai microrganismi. Il metodo di Gram invece non può servire come criterio differenziale, perchè spesso le granulazioni delle cellule di Ehrlich restano colorate anche con tal metodo.

Accenniamo infine al fatto, che nella colorazione col metodo di Gram si formano talora sul preparato depositi granulari di sostanze

(1) Koch, *Wundinfectionskrankheiten*, p 38.

coloranti, che possono simulare i micrococchi; se ne distinguono però per la forma e per la disposizione loro irregolari.

La seconda classe d'errori comprende il caso in cui nel corso delle manipolazioni istologiche, oppure in causa della putrefazione, si aggiungono ai tessuti microrganismi, che non hanno nulla a che fare colle alterazioni patologiche delle quali si ricerca l'origine, e che potrebbero essere giudicati erroneamente come elementi parassitarî. Possono infatti trovarsi microrganismi nelle soluzioni coloranti, specialmente di carmino e di ematossilina, o nell'acqua distillata che ne contiene sempre in certa quantità, e depositarsi nei preparati. Basta però averne veduto una volta per imparare subito a riconoscere questa sorgente d'errore, che si dovrebbe del resto sempre evitare, sterilizzando l'acqua che si adopera per le manipolazioni istologiche. Taluni però hanno l'abitudine di lasciare le sezioni magari per un giorno e più nell'acqua distillata, e creduta priva di germi, ed allora si possono raccogliere sulla superficie e sui margini delle sezioni stesse un'infinità di microrganismi, i quali poscia colorati possono far cadere gli inesperti in errori grossolani.

Havvi infine il processo naturale di putrefazione, il quale, specialmente nei casi di malattie infettive, è assai rapido e precoce ed è accompagnato dalla presenza di numerosi microbi. Si deve sempre sospettare che si tratti di ciò, quando si incontrano forme di microrganismi isolate alla periferia degli organi.

Fortunatamente però questi esseri microscopici, che accompagnano e producono la putrefazione (generalmente in principio non sono che grossi bacilli), si riconoscono con facilità, ed è difficile scambiarli coi microparassiti. Tuttavia è sempre bene esprimersi con riserva, a riguardo dei risultati dell'osservazione di tessuti in cui è già avviato il processo di decomposizione; e quando si tratta di ricerche negli animali, si deve sempre farne l'esame appena dopo la morte, od anche uccidere l'animale quando è prossimo a morire.

In terzo luogo si è detto che, quand'anche colla colorazione non si riesca a mettere in evidenza nessuna specie di microparassiti, non sempre si è autorizzati ad escluderne la presenza nei tessuti presi in esame, potendovene essere alcuni, i quali sono indifferenti verso i metodi di colorazione usati fino ad oggi. Pur troppo non tutti cotesti elementi parassitarî si colorano egualmente, e non si conosce ancora un metodo veramente generale, che serva sicuramente per tutte le specie, giacchè l'azione che esercitano le varie sostanze coloranti su questi esseri è tutt'altro che costante ed uniforme, ed ognuno ha per un dato colore un'affinità speciale.

Finalmente è da ricordare ancora un piccolo difetto che ha

talvolta la colorazione per queste ricerche. Quando gli elementi parassitarî si trovano riuniti in masse molto dense e compatte (zooglee), la colorazione, specialmente se intensa, li rende meno trasparenti e li fa apparire quali masse uniformi; mentre invece, trattando i tessuti coi reattivi dissolventi, si distinguono bene i singoli individui da cui sono costituiti quei gruppi.

Ad ogni modo però resta fermo il fatto, che noi abbiamo nella colorazione, specialmente se è unita coll'uso dell'apparecchio illuminatore di Abbe, un mezzo potentissimo di aiuto, che ci permette di riconoscere anche la presenza di forme isolate di microbi in mezzo agli elementi dei tessuti, e di studiare bene le loro proprietà morfologiche ed i rapporti che assumono colle varie parti dei tessuti.

5. Ricerca dei microparassiti nell' organismo animale.

L'importanza che ha acquistato in questi ultimi tempi lo studio dell'eziologia delle malattie d'infezione è invero grandissima, e gli studî dei patologi debbono oramai su questo terreno essere rivolti a rintracciare con cura la presenza di microbi eziandio in quelle malattie, delle quali non si è ancora dimostrato con sicurezza il nesso causale con forme speciali di microrganismi patogeni. Ma questo compito per quanto è importante, altrettanto è difficile da eseguirsi; e noi, nello additare la via migliore da tenere per tali ricerche, seguiremo le norme dettate da Koch. e divideremo la questione in *tre problemi principali*, la cui soluzione completa è indispensabile per acquistare la certezza della natura parassitaria di una malattia infettiva.

1.° Anzitutto dev'essere dimostrata negli organi ammalati una data specie di microrganismi, sufficientemente caratterizzati per proprietà morfologiche, in tutti i casi di quella tale malattia; questi noltre devono trovarsi nel corpo ammalato in tale quantità, e distribuiti in modo, che servano a spiegare l'origine dei fenomeni morbosi.

2.° Stabiliti questi fatti, viene in seconda linea il compito di coltivare *isolatamente*, al di fuori dell'organismo, i microbi specifici nei mezzi di nutrizione più adatti pel loro sviluppo, e specialmente in quelli *solidi* e *trasparenti* di Koch. Su questi si devono studiare le proprietà morfologiche, chimiche e fisiologiche del parassita, facendolo riprodurre nei mezzi di nutrizione attraverso parecchie generazioni, cercando di scoprire il modo con cui penetra nell'organismo animale, e seguendolo nei suoi rapporti coll'aria, coll'acqua e col terreno.

3.° Finalmente, dopochè trasportando piccolissime porzioni di

quelle colonie da uno ad un altro nuovo terreno nutritivo, successivamente, si è acquistata la certezza che l'ultima generazione non contiene più nessuna traccia di sostanze organiche, provenienti dal corpo animale primitivamente ammalato, si deve innestare negli animali il prodotto puro dell'ultima cultura, nello intento di riprodurre in questi la stessa forma di malattia che ha fornito il materiale per la prima cultura. Quando ciò si è ottenuto, nei tessuti dell'animale inoculato si debbono dimostrare gli stessi microbi primitivi coi loro caratteri ben definiti.

Per quel che riguarda la prima e la seconda di queste condizioni, indispensabili tutte per l'esatta dimostrazione della natura parassitaria del male, non è sempre facile di poterlo stabilire in modo chiaro e positivo, giacchè in certi organi, i quali sono in rapporto più o meno diretto col mondo esterno (cute, apparecchio respiratorio, digerente e genito-urinario), si trovano come ospiti normali parecchie specie di microbi. In tal caso è necessario ottenere anzitutto isolata ciascuna specie di essi, e provare successivamente negli animali quale è che ha importanza pel suo potere patogenico. In questa parte appunto dello studio dell'eziologia delle malattie infettive si è dimostrato il vantaggio grandissimo che ha sugli altri il metodo di coltivazione di Koch, coi materiali solidi e trasparenti; giacchè coi metodi primitivi non si potevano avere guarentigie sufficienti sull'esattezza dei risultati.

Questa esattezza è tanto più necessaria, inquantochè non sempre è possibile di condurre a termine la terza parte del nostro còmpito; anzi può dirsi che per le malattie della specie umana manca spesso quest'ultimo anello della catena logica delle ricerche microparassitarie. Il riprodurre la malattia infettiva per mezzo dell'innesto dei microbi specifici nell'uomo si è fatto per la risipola, per la gonorrea, per la lebbra, per la malaria, e fors'anco pel colèra, ma per altre malattie più pericolose, quali sono le setticemie, non è lecito il farlo.

A questo difetto si può fino ad un certo punto supplire coll'esperimento negli animali più affini, quando questi sieno suscettibili di contrarre la stessa forma morbosa che si sviluppa nell'uomo; ma quando neanche ciò è possibile, si è costretti a ricorrere ai due primi criterî, i quali, se sono stati stabiliti in maniera completa e positiva, permettono sempre di trarre per analogia conclusioni attendibili Allorquando si è parlato delle proprietà biologiche di questi esseri, si sono appunto citati esempi negli animali di malattie eminentemente infettive, le quali tuttavia non sono trasmissibili neppure a specie strettamente affini. Nessuna meraviglia adunque che anche per l'uomo esistano casi analoghi di malattie infettive a lui speciali e non trasmissibili agli altri animali; e se in tal caso manca la prova assoluta e diretta per la dimostrazione della natura parassitaria del male, vi sono tuttavia altri criterî indiretti, è vero, ma altrettanto sicuri per raggiungere l'istesso scopo.

Il trovare in ogni caso della malattia in questione costantemente la stessa forma di microrganismi, e il non trovarla invece in altre malattie e nepppure negli individui normali, il vederla diffusa nei varî organi ammalati in maniera sufficiente per ispiegarne la patogenesi, e finalmente le caratteristiche speciali biologiche che la distinguono dalle altre specie sono tali criterî, che hanno oggimai un grandissimo valore per le conclusioni che se ne possono trarre a riguardo dell'eziologia della malattia che si studia, essendo possibile coi mezzi odierni di ricerca di escludere errori grossolani di scambio con altri microbi che non sieno gli specifici.

Corrispondentemente a quest' ordine di ricerca stabilito da Koch, noi divideremo pure la materia da svolgere, cominciando dall'esporre il modo di rintracciare i microparassiti nell' organismo animale, per passare poscia ai mezzi di nutrizione, ai metodi di cultura, alla maniera di riprodurre cogli innesti l'infezione negli animali, e finalmente alla ricerca dei microrganismi patogeni nei mezzi esterni, aria, acqua e terreno.

A. Esame dei liquidi.

È necessaria per queste ricerche la osservanza più scrupolosa delle cautele di disinfezione e di sterilizzazione di tutti gli oggetti che si adoperano, per evitare, per quanto si può, il mescolarsi di germi estranei coi liquidi da esaminare. Quindi nettezza assoluta dei recipienti ove si raccolgono, degli strumenti coi quali si maneggiano e dei vetri sui quali si osservano al microscopio: tutti gli oggetti che sono di vetro saranno in precedenza accuratamente nettati cogli acidi e coll'alcool, e, se occorre, anche sterilizzati col calore, e conservati in recipienti chiusi lungi dal contatto diretto dall'aria atmosferica. I liquidi devono inoltre essere esaminati allo *stato fresco*, ossia appena estratti dal vivente, o dal cadavere, giacchè anche dopo poche ore si può trovare il numero dei microrganismi grandemente moltiplicato. Non è da consigliarsi adunque di conservare i liquidi, ma di esaminarli subito al microscopio, sia direttamente, sia con l'aiuto dei reattivi coloranti.

Per prendere il liquido che si vuole osservare, se si tratta di sangue del vivente, si comincia dal lavare accuratamente la cute coll'acqua e sapone, e con una soluzione di acido fenico al 5 %, o di sublimato a $^1/_2$ %; si lava poscia coll 'alcool per portar via qualsiasi traccia del disinfettante adoperato (avvertenza indispensabile quando si voglia col sangue fare coltivazioni) e infine coll'etere, e dopo che questo si è svaporato, si fa un'incisione con una lancetta previamente arroventata, oppure si pone allo scoperto e si apre una piccola vena, e si accoglie immediatamente il sangue, facendone preparati e culture secondo il caso. Si può anche coprire la cute con un sottile strato di collodion, lasciarlo essiccare e fare la puntura attraverso questo strato, per far sì che il sangue si espanda su questo. e non venga a contatto colla pelle e coi suoi microrganismi.

Si consiglia pure da alcuni di porre sul luogo dove si vuol fare il taglio una goccia di soluzione di cloruro sodico indifferente (0,8 %) sterilizzata, incidere la cute attraverso alla goccia con un bistorì

disinfettato e con un altro bistori aprire il vaso sanguigno: il sangue misto alla soluzione di cloruro sodico si raccoglie e si adopera come sopra.

Finalmente si può anche raccogliere il liquido sanguigno introducendo in una vena, posta allo scoperto colle norme antisettiche, un tubo di vetro capillare sterilizzato (Salomonsen). Anzi, quando si debba raccogliere una certa quantità di sangue (8-10 cc.), per fare sviluppare i microrganismi che eventualmente vi si contengono nello stesso sangue estratto, val meglio introdurre nella vena messa allo scoperto, oppure attraverso la pelle intatta, disinfettata, l'ago-cannula di una siringa Tursini, ed aspirare in questa, mediante una pompa, la quantità di sangue che si desidera.

Le norme che servono per raccogliere il sangue si applicano egualmente per qualunque altro liquido dell'organismo animale vivente (contenuto di flittene, pus, ecc.).

L'esame dei liquidi, diretto allo scopo speciale della ricerca dei microrganismi, può essere fatto in due maniere:

a) Esame diretto; *b*) Esame coi reattivi.

a) Esame diretto. — Goccie pendenti.

L'esame diretto del materiale vivente è quello che dovrebbe farsi prima di ogni altro e che non deve mai essere trascurato, avendo interesse per potere studiare alcune proprietà biologiche e morfologiche dei microrganismi. Soltanto per chi comincia, siccome si tratta di una ricerca un po' delicata, è da consigliarsi di far questo genere di esame dopo aver preso esatta cognizione dello stesso materiale, ma coll'aiuto dei reattivi coloranti.

La tecnica è semplicissima; si prende una goccia del liquido coll'ago di platino sterilizzato sulla fiamma, oppure con una pipetta egualmente sterilizzata, e si pone su di un vetro portoggetti; si copre con un vetrino, e si chiude ai margini con cera o con paraffina liquefatta. Si comprende facilmente che i vetrini, coproggetti e portoggetti, debbono essere accuratamente puliti, e occorrendo anche sterilizzati. Per facilitare l'osservazione si usa spesso diluire il liquido che contiene microbi con acqua, oppure colla soluzione di cloruro sodico indifferente, o con una di peptone sterilizzata, per evitare che quelli, essendo numerosi ed ammassati, offrano un'imagine confusa: quando poi si tratta di osservare culture fatte sui mezzi solidi, il materiale deve sempre essere diluito nell'acqua. Se invece il liquido non contiene un gran numero di microrganismi, e se si vuole avere la certezza assoluta che quelli che vi si trovano ap-

dartengono in realtà al liquido stesso, val meglio farne l'esame senza aggiunta di sorta.

L'osservazione di questi preparati dev'essere fatta cogli obbiettivi ad immersione, con un diaframma stretto e nelle migliori condizioni di illuminazione, per poter distinguere i particolari di forma dei microrganismi incolori.

Questa maniera semplice di osservare i batterî allo stato naturale, offre specialmente l'inconveniente del movimento rapido e continuo dei batterî contenuti nello strato liquido fra i due vetrini, movimento che è dovuto in parte alla mobilità propria di alcuni di essi, in parte al così detto « movimento browniano » e in parte anche alle correnti che si formano nel liquido per opera dell' evaporazione, che sempre si effettua ai margini del preparato. Cosicchè i preparati così fatti possono servire tutt'al più per una ricerca grossolana, per sapere, ad es., se si tratta di bacilli o di micrococchi, ma non più in là.

Per istudiare invece la mobilità, e fino ad un certo punto, la forma e la struttura dei microrganismi, servono meglio i preparati fatti sotto forma di *goccie pendenti*.

Si è già parlato delle « camere umide », e si è visto che la più semplice di esse è un portoggetti incavato, oppure un portoggetti su cui si è fissato con mastice un anello di vetro, o di cartone, circolare. Per osservare i microrganismi nelle goccie pendenti si deposita su di un coproggetti, con una grossa ansa di platino, una goccia del liquido contenente i microbi, grossa come una lenticchia, si capovolge il vetrino sul cavo del portoggetti, e se ne chiudono i margini con vaselina, o con paraffina. Bisogna badare a che il liquido non contenga troppi batterî, altrimenti la loro osservazione riesce difficile; bisogna adunque, se si tratta di culture liquide, diluirle, e le culture solide stemperarle convenientemente nell' acqua distillata, o nella soluzione di cloruro sodico indifferente, od anche meglio nel brodo o nel siero sanguigno sterilizzato, per essere certi di non alterare la forma e la vitalità dei microrganismi.

L'osservazione microscopica delle goccie pendenti deve farsi anzitutto con un obbiettivo debole, per porre nel campo del microscopio una parte del margine della goccia; e ciò a fine di facilitarne l'osservazione successiva coll'obbiettivo ad immersione, la quale riescirebbe difficile se fatta di primo acchito, specialmente per mettere a fuoco l'obbiettivo. Non di rado infatti succede a chi è poco esperto di simili osservazioni di spingere troppo in giù l'obbiettivo e di rompere il vetrino. L'osservare i margini della goccia ha inoltre il vantaggio di lasciar vedere i batterî in uno strato di liquido più sottile, più isolati e meno liberi nei loro movimenti

quando si tratta di specie mobili. Questo modo di osservazione è specialmente adatto per stabilire la mobilità dei microrganismi e le particolarità del loro movimento; giacchè, a seconda della posizione e del numero delle ciglia, varia in essi la maniera di estrinsicarsi del loro movimento (movimenti di oscillazione lungo l'asse maggiore, movimenti ameboidi, ecc.).

Bisogna distinguere il vero movimento proprio dei batterî, la *locomozione*, dal semplice movimento danzante, o browniano, che hanno tutti i corpi sottili, sospesi nei liquidi; e per ciò basta aver prima esercitato l'occhio a quest' ultima specie di movimento, mescolando nell'acqua, ad es , una piccola quantità di carmino finamente polverato, ed osservandolo al microscopio, evitando il disseccamento del preparato e la formazione di correnti; i granuli di carmino si vedono in preda ad un movimento vivacissimo, che però si riconosce non essere una vera locomozione, ma una specie di vibrazione sul luogo.

L'esame batteriologico dei liquidi sotto forma di goccie pendenti, oltre che per l'osservazione del movimento dei batterî, serve anche a studiare altre proprietà biologiche di essi, quali il processo di scissione, la formazione delle spore e la germinazione di queste.

b) Esame coi reattivi. — Preparati sui coproggetti.

Il principio dell'azione di queste sostanze è quello di tutte le altre congeneri usate in istologia; di mettere, cioè, in evidenza i microrganismi a preferenza di tutti gli altri elementi coi quali si trovano per avventura commisti. La via che conduce al conseguimento di questo scopo può essere duplice: 1.° Si può mettere a profitto la proprietà che hanno questi esseri di resistere all'azione di certe sostanze, meglio che gli elementi organici dei tessuti, i quali si rendono con tal mezzo invisibili. 2.° Si può invece, con risultato incomparabilmente migliore, valersi dell'azione delle sostanze coloranti.

Il primo metodo è stato usato da Recklinghausen e da Klebs, e le sostanze che vi si adoperano, così dette *reattivi dissolventi* o *rischiaranti*, sono principalmente gli *acidi* e gli *alcali*, e in qualche caso anche l'*etere* e il *cloroformio*. In generale si usa l'acido acetico in soluzione concentrata (50 %), oppure una soluzione tenue di soda o di potassa ($^1/_2$-1 %), aggiungendone una goccia al preparato fissato sul coproggetti ed osservando quindi al microscopio. I microrganismi resistono per la maggior parte all'azione del liquido aggiunto, e mostrano, osservando il preparato con diaframmi stretti, contorni netti e decisi, mentre gli elementi dei tessuti divengono trasparenti fin quasi a scomparire.

Se si tratta di microbi riuniti sotto forma di zooglea, questo processo serve abbastanza; anzi è l'unico caso in cui può riuscire utile, anche a preferenza dell'uso delle materie coloranti, che fanno apparire le zooglee sotto l'aspetto di masse omogenee; ma, all'infuori di questo caso, questo metodo è insufficiente, e lo è per molti motivi. Anzitutto perchè non si può dire che tutti i microbi resistono all'azione delle sostanze dissolventi: chè anzi sappiamo che vi sono alcune specie di microparassiti, sottili e delicati, i quali, anzichè resistere all'azione degli acidi e degli alcali, non resistono neanche a quella della semplice acqua. Tale è il caso, ad es., dello « Spirochaete Obermeieri », il quale si altera persino nell'acqua distillata; lo stesso accade, secondo le osservazioni di Israel (1), anche pei giovani nodi di « Actinomyces », i quali debbono perciò essere ricercati senza aggiunta di nessun liquido estraneo. Ma vi sono anche altre sorgenti d'errore, ad es., nei granuli di materie inorganiche, che possono essere scambiati con micrococchi, nonchè nei piccoli cristalli aghiformi, che possono avere l'apparenza di bastoncini. Lo stesso dicasi per le minutissime goccie di grasso, le quali, se posseggono un involucro albuminoso, resistono anche all'azione dell'etere e del cloroformio. Il metodo basato su queste semplici reazioni microchimiche può quindi talvolta essere d'aiuto nella ricerca dei microparassiti nei liquidi, ma di per sè è assolutamente insufficiente

Anche nella tecnica di queste ricerche siamo debitori a Koch di un progresso notevolissimo, che egli ha conseguito combinando il metodo di *fissamento* col calore, usato la prima volta da Ehrenberg per conservare i microrganismi, con quello della colorazione, costituendone così un nuovo metodo pei *preparati sui coproggetti*, che porta il suo nome, e che permette non soltanto di eliminare le difficoltà che rimanevano ancora coi processi primitivi, ma anche di poter conservare i preparati.

Il principio generale di questo metodo è, secondo le parole stesse di Koch, « di essiccare il liquido contenente microbi in istrato sottile sui vetrini coproggetti, per fissarveli, di trattarli colle sostanze coloranti e rammollirli di nuovo, per renderli visibili e riportarli alla forma loro primitiva, e di chiudere il preparato in liquidi conservatori ». I particolari adunque del metodo sono di tre specie:

a) *Fissamento* del materiale contenente i microrganismi. I preparati non fissati si colorano male; ma d'altronde molti microrganismi, se vengono sottoposti per molto tempo all'azione dell' alcool o di altri mezzi che servono per fissarli, come pure se rimangono disseccati lungamente, perdono la loro affinità per le materie coloranti. Bisogna adunque, per regola generale, non lasciare agire troppo a lungo i mezzi di fissamento, giacchè i più bei preparati si ottengono dai liquidi (come dai tessuti), i quali sono stati fissati in breve tempo.

(1) Berl. klin. Wochenschr., N.° 23, 1884.

Il primo e il più semplice mezzo di fissare i liquidi è il *disseccamento*.

Dopo essersi orientati coll'esame precedente del liquido sul contenuto di questo in microrganismi e sulla forma e mobilità degli stessi, si prende coll'ago di platino una gocciolina del liquido e se ne prepara anzitutto uno strato sottile su di un coproggetti, sia distendendovelo per mezzo dello stesso ago di platino, e sia schiacciando la gocciolina con un altro vetrino sovrapposto, sfregandoli l'un contro l'altro colle dita e distaccandoli rapidamente in direzione orizzontale. Se si tratta di un liquido denso, o molto ricco di microrganismi, lo si diluisce prima convenientemente con acqua distillata e sterilizzata, e se si hanno da esaminare culture sviluppate su mezzi solidi, se ne prende una piccola quantità coll'ago di platino, si stempera in una gocciolina d'acqua deposta sul coproggetti e si distende come sopra.

Il preparato disteso sul coproggetti dev' essere lasciato *disseccare all' aria*, tenendolo al riparo dal pulviscolo atmosferico. L'essiccamento all'aria si opera in generale rapidamente, ma lo si può anche affrettare, ponendo il preparato in un essiccatore, o dirigendovi sopra un getto d' aria, oppure tenendolo fra due dita al disopra di una fiamma, a moderato calore.

Come Koch ha dimostrato, il disseccamento non altera punto la forma dei microrganismi. Questi restano soltanto leggerissimamente ed uniformemente rimpiccioliti, ma basta inumidire il preparato per vederli tosto tornare alle dimensioni primitive.

Il disseccamento però non è sempre un mezzo fissativo sufficiente. Se si tratta di liquidi non albuminosi, può bastare di farli soltanto essiccare e poscia colorarli; ma se invece il liquido contiene albumina, come è appunto dei liquidi animali (succo dei tessuti, sangue, pus, sputo), quella col semplice disseccamento non diventa insolubile, e quindi in contatto colle soluzioni acquose coloranti lo strato si rammollisce e spesso anche si distacca dal vetrino, depositandosi in pari tempo sul preparato precipitati granulosi delle maiterie coloranti. Per evitare questo inconveniente, bisogna rendere nsolubile l'albumina che si contiene nello strato liquido essiccato e questo si può ottenere, sia per mezzo del *calore*, sia per mezzo; dei *reagenti chimici* che coagulano l'albumina.

È stato Ehrlich il primo ad applicare il calore pel fissamento dei liquidi albuminosi (sangue), distesi in lamine sui coproggetti. Egli però, per le sue ricerche speciali, assoggettava i preparati per una o più ore ad una temperatura di 120-130° C.; e Koch ha invece dimostrato che l'azione del calore, così forte e prolungata, impedisce

poi la colorazione dei microrganismi, e basta invece tenere i preparati per 2-10 minuti al più alla temperatura anzidetta, per rendere insolubile l'albumina senza distruggere l'affinità dei microbi pei colori d'anilina.

Più utile perciò ed anche più spiccio è il metodo proposto da Koch, ed ora usato generalmente per fissare i preparati dei liquidi albuminosi. Consiste nel prendere con una pinzetta il vetrino, collo strato di liquido essiccato e rivolto all'insù, e nel farlo passare per *tre volte* consecutive, con velocità moderata, attraverso la fiamma incolora d'un becco di gas o di una lampada ad alcool. Con un po' di pratica si impara presto il grado di velocità, col quale è necessario far passare il vetrino attraverso la fiamma, perchè si riscaldi abbastanza a che l'albumina divenga insolubile, senza alterare la forma degli elementi e la loro colorabilità.

L'atto quindi del fissamento col calore attraverso la fiamma esige certe precauzioni, perchè corrisponda bene allo scopo. Anzitutto il preparato dev' essere perfettamente secco, prima di essere passato sulla fiamma, altrimenti l'albumina col calore coagula, e si formano precipitati granulosi che trattengono tenacemente i colori d'anilina: in secondo luogo il riscaldamento non dev' essere eccessivo, perchè altrimenti alcuni batterî non sono più suscettibili di colorazione, oppure si alterano nella loro forma, come avviene, ad es., dei bacilli carbonchiosi, i quali nei preparati soverchiamente riscaldati appaiono sotto forma di granuli irregolari.

Con tutto questo però succede sempre una leggiera alterazione della forma dei microrganismi. Koch ha infatti osservato che i bacilli carbonchiosi, fissati col calore nel modo anzidetto, appaiono un po' più sottili e più delicati, e la segmentazione loro caratteristica è meno evidente, di quello che se invece furono semplicemente essiccati e colorati col bruno d'anilina, sciolto nel miscuglio di glicerina e di acqua. Questa circostanza è da tenersi a memoria, per usare sempre l'*identico* processo di preparazione, quando si vogliono istituire confronti fra diversi preparati, tanto più che molte specie di microbi si rassomigliano assai nella forma gli uni cogli altri.

Il metodo di fissamento per mezzo del calore ha pure il vantaggio di poter preparare un gran numero di vetrini coi succhi dei varî organi e tessuti, tolti da un cadavere necroscopizzato, ad es., lungi dal laboratorio, e di poterli così conservare per la successiva colorazione ed esame.

Il fissamento dell'albumina nei liquidi lasciati essiccare sui vetrini in lamina sottile si può ottenere eziandio col mezzo dei reagenti chimici, *alcool, acido cromico e suoi sali, acido osmico, allume e tannino.* Koch per l'esame del sangue, fatto allo scopo di cui è qui parola, ha proposto di tenere immersi i coproggetti collo straterello di sangue nell'alcool assoluto per qualche giorno, finchè, cioè, l'albumina è diventata insolubile. Questo metodo ha il vantaggio di coagulare l'albume, a grado, a grado, di non alterare per nulla la colorabilità dei microbi e di impedire la formazione dei precipitati

granulosi che disturbano l'osservazione. Ha però l'inconveniente di non potersi determinare in precedenza il tempo che i preparati devono essere tenuti nell'alcool; talora basta un giorno, e altre volte invece sono necessarie più settimane perchè lo strato albuminoso divenga insolubile. Il miscuglio a parti eguali di alcool e di etere agisce invece più rapidamente, giacchè bastano 1-2 ore per ottenere il fissamento dello strato albuminoso sul vetrino.

È naturale però che, quando nelle ricerche batteriologiche è necessario di orientarsi subito sulla presenza o meno di micropa-rassiti nei succhi dei tessuti, non si aspetterà il coagulamento operato dall'alcool, ma si userà invece il mezzo più spiccio del riscaldamento.

Un metodo più rapido per ottenere coll'alcool la coagulazione dell'albumina è quello di assoggettare il preparato all'azione dei *vapori* di alcool assoluto. Si prende un vetrino da orologio che sia profondo, vi si versano dentro due goccie di alcool assoluto, e sopra si pone il vetrino, colla superficie a cui aderisce lo straterello di materiale essiccato rivolta verso il liquido, senza però che ne sia tocca. Si copre con un altro vetro da orologio, e si riscalda a calore moderato. Si può anche usare per lo stesso scopo la soluzione di acido cromico a 0,5 %, oppure i vapori di acido osmico, nella maniera esposta per quelli dell'alcool.

Questi reagenti chimici hanno il vantaggio di rispettare gl'involucri gelatinosi e le ciglia dei microbi, meglio che il calore; ma hanno d'altronde l'inconveniente che l'albumina si coarta spesso con troppa rapidità, in modo da alterare l'aspetto morfologico dei microrganismi, i quali inoltre non sono più in grado di riacquistare la forma primitiva, essendo difficile di rammollire lo strato così coagulato. Si può però impiegare, dopo l'azione dei reagenti suddetti, un liquido che renda all'albumina coagulata una certa plasticità, senza farla distaccare dal vetro, e permetta all'elemento parassitario di riprendere le sue caratteristiche morfologiche naturali. Koch ha proposto per tale oggetto la soluzione di acetato di potassa (1 : 2), la quale serve bene, e rende soltanto i microbi un po' più pallidi e un po' più trasparenti: il che poi non è un grande inconveniente, specialmente per quelli che sono grandi e contengono spore. Questo liquido ha inoltre il vantaggio di conservare inalterata la forma degli elementi parassitarî anche per mesi; cosicchè si possono osservare e conservare in pari tempo nella soluzione anzidetta, avvertendo semplicemente di chiuderli con uno strato di paraffina posto ai margini del coproggetti.

b) *Colorazione.* — Per quanto riguarda la colorazione del preparato disteso in lamina sottile, disseccato e fissato sul coproggetti, come si è detto, havvi poco da aggiungere a quanto fu esposto riguardo ai metodi generali di colorazione. Pei preparati sui

coproggetti si useranno o le soluzioni semplici, acquose o idralcoolicne, oppure quelle di Ehrlich, di Löffler, di Kühne, a seconda dei casi, come già fu esposto.

Il modo di portare la soluzione a contatto del preparato può essere vario. Si depone il coproggetti su di un piano bianco (carta) colla faccia che porta il preparato rivolta all'insù, e vi si versano sopra alcune goccie della soluzione colorante; oppure, quando si debba tenere lungamente a contatto, si versa la soluzione in un vetrino da orologio e vi si lasciano nuotar sopra i coproggetti colla superficie su cui è il preparato rivolta all'ingiù.

Il tempo di contatto varia pure a seconda della sostanza colorante, ed a seconda della varia specie di microbi. Quando si adopera la fucsina o la genziana, basta un tempo minore che quando si adopera invece l'azzurro di metilene. Quando i preparati si fanno semplicemente per orientarsi sulla presenza, o meno, di batterî conosciuti e facili a colorarsi, bastano in generale pochi secondi. Sulle differenze del tempo necessario alla colorazione dei varî microparassiti, si è già tenuto parola nei metodi speciali.

La soluzione colorante può infine lasciarsi agire a freddo, oppure essere riscaldata. Il riscaldamento si può fare tenendo il preparato, su cui si è versata la soluzione colorante, colla pinzetta sopra la fiamma, oppure riscaldando il vetrino da orologio che contiene la soluzione colorante coi coproggetti direttamente sulla fiamma, o entro una stufa a 55° C.

Nei preparati sui coproggetti si può ottenere, se si vuole, la colorazione isolata dei microrganismi col metodo Koch (soluzione concentrata di carbonato potassico), o col metodo Gram. Si può anche ottenere la colorazione doppia, come nelle sezioni dei tessuti e cogli stessi metodi; ma questa per tali preparati è utile soltanto in pochi casi speciali (colorazione degli sputi tubercolari e del pus gonorroico).

Il preparato, dopo averlo tenuto a contatto colla sostanza colorante, si lava in generale con acqua distillata, oppure si decolora rapidamente con alcool, si lava con acqua, e lo si osserva al microscopio immerso in una goccia d'acqua distillata. Per far ciò si asciuga con carta bibula, o con un panno fine, la superficie del vetrino dove non è il preparato, si depone sul portoggetti una goccia d'acqua sterilizzata e vi si adagia sopra il preparato. L'osservazione microscopica si fa poi colle cautele già descritte.

Se il preparato si vuol conservare, lo si lascia essiccare all'aria, e poscia si passa al 3.° momento del metodo di preparazione, che è:

c) *La conservazione dei preparati.* — I preparati si possono chiudere nel balsamo del Canadà, nella gomma damar, nella soluzione di acetato di potassa, o finalmente nella glicerina.

Nel balsamo o nella damar si possono chiudere i preparati fatti con qualsiasi colore d'anilina. Dopo che si sono decolorati, o semplicemente lavati coll'acqua, si lasciano essiccare e si conservano in una goccia di balsamo sciolto nella trementina, nella benzina, o nel xilolo, non però nel cloroformio, il quale scioglie facilmente i colori d'anilina. È necessario ricordare che nel balsamo i microrganismi diminuiscono un poco del loro volume; sicchè, se si vuole conservarli nella loro forma e grandezza naturale, come anche quando se ne vuol fare la fotografia, val meglio conservarli nella soluzione concentrata d'acetato potassico, chiudendoli dopo averli decolorati, senza farli essiccare, e circondando il vetrino con un po' di mastice.

La glicerina non serve che pei preparati fatti coi colori bruni, giacchè scioglie gli altri colori d'anilina; pel bruno d'anilina però costituisce il mezzo migliore di conservazione. —

Ricapitolando, il metodo comune pei preparati sui coproggetti consta dei seguenti momenti.

1.° Distensione del liquido in istrato sottile sul coproggetti e suo essiccamento all'aria.

2.° Fissamento operato dal calore diretto della fiamma (passaggio attraverso ad essa per 3 volte).

3.° Colorazione col liquido colorante e successiva lavatura con acqua, oppure leggera decolorazione con alcool e lavatura con acqua.

4.° Osservazione del preparato in una goccia d'acqua, disseccamento e chiusura nel balsamo.

Per terminare ciò che riguarda la tecnica di questi preparati, che sono quelli che si fanno in maggior numero nelle ricerche batteriologiche, è bene esponiamo ancora qualche particolare relativo alla maniera di fare preparati, sia coi prodotti delle diverse culture, sia coi varî liquidi dell'organismo animale.

Quanto alle culture, si è già detto come devono essere allestiti i preparati, a seconda che si tratta di culture sviluppate nei mezzi liquidi, oppure nei mezzi solidi di nutrizione. In certi casi interessa però di osservare nei preparati anche la intiera colonia di un microrganismo, e di conservarla colla forma speciale di aggruppamento che assumono in essa i batterî, e che per certe specie è caratteristica. Per questi preparati è necessario avere lo sviluppo di colonie isolate sulla gelatina distesa in lamina sottile sulle lastre

di vetro, o nelle scatole di Petri: si copre allora una delle colonie con un vetrino coproggetti, lo si comprime perchè quella aderisca al vetro, e si distacca poscia rapidamente. Si lascia disseccare e si tratta come al solito. — Si può anche fare un innesto del microrganismo in una goccia di gelatina deposta su di un coproggetti sterilizzato, lasciare sviluppare la colonia in una camera umida, e poscia farla disseccare, fissarla e colorarla col metodo già esposto.

Per ciò che riguarda i liquidi animali, il sangue ed il succo dei varî organi (che si esaminano sempre, per orientarsi, nelle necroscopie degli animali inoculati), se ne depone prima una goccia su di un coproggetti coll'ansa di platino, o col bistorì, oppure stropicciandovi sopra un pezzetto di organo (fegato, milza), e si distende in istrato sottile sfregandovi sopra il margine di un altro vetrino. Questo metodo, specialmente pel succo degli organi che in generale è molto denso, è preferibile all'altro, che si può usare invece pel sangue, e che consiste nello schiacciare la gocciolina fra le superfici di due coproggetti, separandoli poscia rapidamente in direzione orizzontale, in modo che resti aderente a ciascuno di essi uno straterello di sangue. Quando si allestiscono preparati con quest' ultimo metodo, non bisogna comprimere troppo i due vetrini, altrimenti frantumandosi i nuclei, si originano certe figure strane, di cometa, le quali essendo composte di sostanza nucleare restano colorate come i microrganismi, e possono trarre in errore i poco esperti, simulando forme di bacilli capocchiati, o simili.

Per evitare questa ed altre sorgenti d'errore, che si possono avere, ad es., nei granuli albuminoidi simili ai cocchi, e anche per impedire che nei preparati di sangue il plasma ed i corpuscoli, colorandosi intensamente, impediscano l'osservazione dei batterî che vi si contengono, si possono trattare i preparati col metodo proposto da Günther (1), che consiste nell'immergerli per pochi secondi, dopo averli fissati col calore, in una soluzione di acido acetico da 1 a 5 % e lavarli poscia abbondantemente coll'acqua. In tal guisa l'emoglobina dei globuli rossi e il plasma sanguigno vengono disciolti e portati via, senza che si alteri la fissazione dei batterî. Si dissecca allora il preparato e si colora come d'ordinario, restando ben colorati i microrganismi, e poco o nulla tutto il resto. Se il preparato di sangue è disseccato da qualche tempo, questo metodo più non riesce; ed allora si può ottenere lo stesso effetto trattando i preparati con una soluzione acquosa di pepsina al 2 %, la quale peptonizza e discioglie le parti protoplasmatiche.

(1) Opera citata, p. 59.

Non è però strettamente necessario usare pei preparati di sangue un simile processo, giacchè, specialmente se lo strato è sottile, basta decolorare leggermente con alcool per avere scolorati a sufficienza i globuli e il plasma.

Il sangue merita per le ricerche batteriologiche una speciale attenzione, anzitutto perchè in esso si contengono talora parassiti, non appartenenti alla classe dei batterî, come sono quelli della malaria, ed altri parassiti ameboidi descritti da Lewis e da Koch nel sangue dei ratti, e da Danilewsky in quello degli uccelli, i quali col metodo ordinario dei preparati sui coproggetti si alterano nella forma e difficilmente si colorano; ed in secondo luogo perchè il sangue contiene certi granuli liberi, provenienti dal disfacimento di alcuni suoi elementi morfologici, i quali possono essere presi per micrococchi.

In base a questi fatti è sempre da raccomandarsi l'osservazione del sangue allo stato fresco, e questa deve poi assolutamente essere preferita a quella dei preparati disseccati, nello studio del sangue contenente i parassiti della malaria od altri congeneri. Secondariamente poi è da raccomandarsi lo studio e l'osservazione delle granulazioni del sangue, per chi vuol porsi in grado di evitare quella causa d'errore.

Ehrlich (1) fu il primo a dimostrare che quegli elementi morfologici, incolori, del sangue, che si distinguono col nome generico di « globuli bianchi », lungi dall'essere tutti eguali, come appare dall'esame loro superficiale, hanno invece una costituzione diversa, e probabilmente anche un'origine e un significato fisiologico corrispondente. Queste varietà di globuli bianchi si differenziano specialmente pel loro *contenuto granulare* protoplasmatico, il quale non solo ha diversa la forma, la grandezza, il potere di refrazione e la distribuzione nel corpo della cellula, ma si comporta anche diversamente verso i reattivi dissolventi e verso le varie sostanze coloranti d'anilina.

Riguardo a quest'ultima proprietà, che fu specialmente studiata da Ehrlich, questi ha distinto le granulazioni, e rispettivamente le cellule che la contengono, in:

1.° *eosinofile,* grosse, tondeggianti, fortemente rifrangenti e colorabili coi colori acidi di anilina. Le cellule eosinofile d'origine mielogena sarebbero, secondo Ehrlich e i suoi scolari (2), assai scarse nel sangue umano normale ed abbondanti invece nei casi di leucemia e di alterazioni croniche degli organi ematopoetici.

Tali granulazioni nel sangue di pollo hanno la forma di bastoncini, e quando le cellule si rompono nel fare il preparato, assumono l'aspetto di accumuli di bacilli (V. Tav. V. Fig. 2 e 3).

(1) Le pubblicazioni di Ehrlich sull'argomento si trovano sparse nei seguenti giornali: « Verhandl. d. phys. Ges. zu Berlin 1878-79, N.° 20. — Zeitschr. f. klin. Med. Dispensa 3ª del Vol. I e II. — Deutsche med. Woch. 1883, N.° 46. — Charitè-Annalen, 1884 ».

(2) Schwarze, *Ueber eosinophile Zellen*, Dissertation, Berlin 1880.
Spilling, *Ueber Blutuntersuchung bei Leucämie*, Dissertation, Berlin 1880.

2.° *basofile*, che si colorano come i batterî coi colori basici di anilina, e sono di due specie:

a) granulazioni sottili che si trovano nei globuli bianchi, grossi, mononucleari, provvisti di poco protoplasma.

b) granulazioni più grosse, appartenenti alle così dette « cellule granulose di Ehrlich », le quali si trovano abbondanti nel sangue dei topi bianchi. Sono specialmente queste che possono essere confuse coi batterî, e che bisogna imparare a distinguere da questi.

3.° *anfofile*, tingibili egualmente coi colori acidi e con quelli basici di anilina. Le cellule che contengono queste granulazioni sono abbondanti nel sangue dei conigli e delle cavie.

4.° *neutrofile*, che si colorano coi colori neutri (composti da due sostanze coloranti, una acida e l'altra basica). Le cellule neutrofile costituiscono la maggior parte dei leucociti polinucleari del sangue umano.

Quando si vogliono studiare queste granulazioni, i preparati di sangue disseccati devono essere fissati a 120° C. per 1-2 ore e poscia colorati.

I granuli basofili e anfofili si colorano colle stesse sostanze che servono pei batterî.

I granuli eosinofili si possono colorare colla soluzione acquosa semplice di eosina, oppure col miscuglio proposto da Ehrlich, composto da 1 parte di soluzione glicerica satura di *aurantia* e 2 parti di glicerina pura, a cui si aggiunge *nero d'anilina* ed *eosina* fino a saturazione.

Per i granuli neutrofili si adopera un'altra miscela, proposta egualmente da Ehrlich, composta da 5 parti di soluzione alcoolica satura di fucsina acida, a cui si aggiunge a poco a poco 1 parte di soluzione satura di azzurro di metilene e 5 parti di acqua distillata: si lascia a sè alcuni giorni e si filtra.

B. Esame dei tessuti.

Molte cose già dette a riguardo della ricerca dei microrganismi nei liquidi valgono egualmente anche per i tessuti, ond'è che, senza ripeterle, accenneremo soltanto a ciò che vi è di diverso e di speciale per l'esame dei tessuti. Qui è necessario aiutarsi coi reagenti, anche più che pei liquidi, giacchè si tratta di parti organizzate, la cui tessitura, più o meno densa e compatta, serve a nascondere facilmente le forme delicate dei microparassiti che vi possono essere contenute, ed il semplice esame microscopico diretto può servire tutt' al più a far distinguere le zooglee. L'unico mezzo di preparare i tessuti per tali ricerche è quello di ridurli in sezioni sottili. Si è già parlato degli istromenti speciali (microtomi) che si adoperano per ciò; ora esporremo i particolari relativi al modo di preparare i tessuti per poterli sezionare, allo spessore delle sezioni ed al successivo loro trattamento.

L'*alcool* è il mezzo migliore per rendere consistenti gli organi nei quali si vuol fare la ricerca dei microrganismi; e siccome i tessuti devono indurirsi in breve tempo, bisogna usare sin da principio l'al-

cool assoluto, o per lo meno un alcool assai concentrato (90-95 %). Si preparano perciò piccoli pezzi degli organi, appena estratti dall'animale, e si pongono in un vaso con molto alcool, usando l'avvertenza di coprire il fondo nel vaso con un poco d'ovatta o di carta da filtro; questo si fa nel triplice scopo, che i pezzi sieno circondati per ogni parte dal liquido, che non sieno a contatto coi detriti organici e col sangue che si separa dai tessuti, e finalmente che si trovino immersi nell'alcool più puro, giacchè l'acqua che viene ceduta dai tessuti tende naturalmente a raccogliersi al fondo. Si deve fare in modo che *in uno o due giorni i pezzi abbiano acquistato la consistenza necessaria per essere sezionati*, perchè alcuni microbi già dopo un soggiorno di 3-4 giorni nell'alcool addivengono difficilmente colorabili.

Invece dell'alcool si può usare la soluzione di acido cromico, o dei suoi sali, ed i vapori di acido osmico, ponendo la soluzione di quest'acido in fondo del vaso e il pezzo da indurire attaccato al sughero che serve per chiuderlo. Questo metodo è semplicissimo ed è anche economico, stante il prezzo piuttosto elevato dell'acido osmico. Questi ultimi mezzi però sono meno adatti del primo pel caso nostro, sia perchè colorano in pari tempo i tessuti, e sia anche perchè rendono più difficile la colorazione di certi microbi. Secondo le osservazioni di Koch (1), conservando gli organi tubercolosi nelle soluzioni cromiche, i bacilli specifici perdono la facoltà di colorarsi. Baumgarten (2) invece sostiene di avere ottenuto bellissime colorazioni degli stessi bacilli da pezzi fatti indurire prima nella soluzione di Müller e poscia nell'alcool. Quando i tessuti sono stati induriti con siffatti reagenti, che in pari tempo li colorano, bisogna, prima di porre le sezioni a contatto dei colori d'anilina, lavarle coll'acqua distillata e porle di nuovo nell'alcool assoluto. Il fissamento coll' acido cromico serve specialmente quando si ha interesse di conservare e di studiare alcune particolarità delicate di struttura, come ad es. la cariocinesi.

Una volta che il tessuto abbia acquistato nell'alcool una consistenza sufficiente, se ne fanno sezioni col microtomo nel modo già esposto. L'inclusione in paraffina sarebbe assai comoda e semplice, ed è anzi la più adatta per ottenere sezioni sottili: però in alcuni casi la disidratazione e la penetrazione nei tessuti degli olii eterei e della paraffina liquefatta rendono più difficile la colorazione dei microrganismi; per cui, quando la qualità speciale del tessuto rende necessaria un'impregnazione, val meglio ricorrere alla celloidina.

Pei tessuti non è necessario, come pei liquidi, farne l'esame allo stato fresco. In principio si credette che il poter fare sezioni degli organi freschi, congelati, per mezzo dei microtomi appositamente provvisti dell'apparecchio refrigerante, costituisse l'ideale della

(1) Koch, *Die Aetiologie der Tuberkulose*, Mitth. a. d. kais. Ges Bd. II, p. 1-88.
(2) Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. I, Heft. 3, p. 453.

tecnica batteriologica per l'esame dei tessuti; ma attualmente invece un tal metodo è stato con ragione quasi completamente proscritto, perchè il congelamento e il successivo disgelo alterano non poco la struttura del tessuto, mentre per orientarsi subito sulla presenza dei batterî nell'interno degli organi è assai più comodo e più spiccio farne col succo preparati sui coproggetti.

Preparate le sezioni, si può, per la ricerca dei batterî allo stato naturale, fare uso dei reattivi dissolventi (acido acetico concentrato, soluzioni di soda e di potassa diluite), i quali, alterando gli elementi dei tessuti, mettono in evidenza i microrganismi che resistono alla loro azione; e questo è un metodo che, come si disse, si è usato per lo addietro con qualche risultato. Baumgarten è riuscito infatti con tal mezzo a porre in evidenza i bacilli tubercolari in mezzo ai tessuti. Ora però si preferisce sempre ricorrere alla colorazione delle sezioni coi colori d'anilina, nei modi già descritti.

Lo *spessore* delle sezioni da colorare deve in generale essere non molto grande, giacchè si tratta per lo più della ricerca di oggetti che hanno dimensioni piccolissime, e che si trovano in mezzo agli elementi istologici, dai quali possono essere facilmente nascosti. Tuttavia è talora necessario anche un certo spessore delle sezioni; e questo è utile specialmente quando i microparassiti sono in numero scarso, perchè allora si possono esaminare in pari tempo parecchi strati del tessuto, ed è più facile il rintracciarli.

Usando il microtomo, si ha il grande vantaggio di potere ottenere per le singole sezioni lo spessore che si desidera, e che è più conveniente in ciascun caso. Per dare una media, utile per chi comincia e non sa quale spessore deve dare alle sue sezioni, dirò che questo non deve in generale oltrepassare i limiti di 0,02-0,05 mm.

I particolari relativi alla colorazione dei microrganismi nei tessuti sono contenuti nella descrizione dei metodi generali e speciali, e sono press'a poco gli stessi di quelli che si usano pei preparati dei liquidi essiccati. Esiste soltanto qualche lieve differenza, relativa al tempo di colorazione ed al trattamento successivo: così, mentre i preparati secchi si possono, una volta colorati, lavare semplicemente coll'acqua per osservarli al microscopio, pei tessuti è necessaria sempre la decolorazione successiva. Per le sezioni inoltre bisogna usare sempre l'avvertenza di passarle nell'alcool, prima di metterle nella soluzione colorante.

Le sezioni di tessuti, dopo essere state colorate, trattate coi reattivi decoloranti e finalmente disidratate, si rischiarano col mezzo degli olii essenziali, di garofano, di trementina, di origano, di ber-

gamotto, di legno cedrino, o col xilolo, e si conservano poscia nella resina damar, o nel balsamo del Canadà sciolto nella benzina, nel xilolo, o nella trementina. La glicerina ed il miscuglio di glicerina e gelatina, proposto da Klebs (1), sono adatti per conservare soltanto i preparati tinti coi colori bruni.

6. Conservazione ed esame delle colonie batteriche.

Molte specie di batterî, sviluppandosi sotto forma di colonie isolate nei mezzi solidi di nutrizione, specialmente nei primi stadî dello sviluppo assumono un aspetto che è caratteristico, e che può servire come criterio diagnostico differenziale delle singole specie.

Sia perchè non sempre si ha tempo e comodità di riprodurre, ogni volta che per lo studio abbisogna, le colonie dei diversi microparassiti, e sia per le collezioni batteriologiche, può interessare al batteriologo di conservare le colonie giovani, ed anche di esaminare la disposizione e la struttura di esse a sviluppo più avanzato.

A tale scopo sono stati proposti diversi mezzi.

Se si tratta di conservare le colonie giovani, sviluppantisi nella gelatina distesa sulle lastre o nelle scatole di vetro, serve bene il processo seguito da Garrè (2), secondo il quale si taglia il pezzo di gelatina colla colonia, si raccoglie colla spatola bagnata d'acqua, si depone su di un portoggetti e si lascia essiccare per 1 ora in un essiccatore con acido solforico, oppure all'aria al coperto dalla polvere, finchè il volume si è ridotto circa della metà. A questo punto vi si versa sopra una goccia del miscuglio di gelatina e glicerina (Klebs), e si copre con un vetrino coproggetti. Quando si voglia utilizzare di nuovo la colonia per farne preparati o culture, non si ha che riscaldare leggermente il vetro e distaccare il coproggetti.

Plaut (3) ha modificato alquanto questo processo, tagliando la gelatina con un coltello leggermente riscaldato, e deponendo il pezzo colla colonia sopra una piccola goccia di liquido deposta sul portoggetti, liquido che può essere, o semplicemente acqua distillata

(1) Il miscuglio di glicerina e gelatina si prepara nella seguente maniera: si fanno macerare nell'acqua distillata 10 gr. di gelatina finissima, finchè si è rigonfiata; si decanta l'eccesso di liquido e vi si aggiungono 10 gr. di glicerina, con qualche goccia di soluzione di acido fenico, o di timolo, per impedire lo sviluppo delle muffe. Raffreddandosi, questa miscela si coagula; ma basta riscaldarla leggermente, perchè si liquefaccia e si possa così adoperare.

(2) Garrè, *Eine Methode zur Conservirung*, ecc,, Fortschr. d. Med. 1886, N.° 12.

(3) Plaut, *Ueber eine neue Methode zur Conservirung und Weiterzüchtung*, ecc., Fortschr. d. Med., 1886, N.° 13, p. 419.

e sterilizzata, oppure una goccia di soluzione disinfettante, oppure una goccia di brodo, a seconda dell'uso a cui si vuole destinare il preparato. Se si vuole semplicemente conservare la colonia per l'osservazione microscopica, si adopera la soluzione disinfettante, e se si ha intenzione di adoperarla in seguito per farne culture, si usa l'acqua sterilizzata; mentre invece adoperando una goccia di brodo, si può il preparato convertire in una camera di cultura anaerobica. Difatti, dopo aver disposta la gelatina sulla goccia di liquido, si riscalda il vetrino leggermente, finchè la gelatina ha preso una consistenza molle, senza diventar liquida addirittura, si copre con un coproggetti sterilizzato, premendo leggermente, e si chiude d'attorno col mastice il preparato. Quando questo debba essere conservato a scopo di cultura, il portoggetti deve previamente essere sterilizzato.

Per conservare le colonie sviluppate sull'agar si può semplicemente, come consiglia Günther (1), tagliare un piccolo quadrato d'agar, e per mezzo della spatola porlo in una goccia di glicerina sul portoggetti, chiudendolo come un preparato istologico ordinario.

Un'utile modificazione a questi metodi, proposta da Sclavo e Gosio (2), consiste nel disidratare le lastre o le scatole di vetro contenenti le colonie (in gelatina come in agar) in un bagno di glicerina purissima, mantenendo il bagno in un ambiente reso secco coll'acido solforico concentrato. Dopo 5-6 giorni le lamine di gelatina o di agar sono ridotte sottili ed asciutte, senza essere raggrinzate, nè aderenti al vetro. Si asportano allora le colonie con un bistorì e si chiudono in glicerina come un preparato istologico ordinario.

Quando si voglia eziandio colorare le piccole colonie, meglio che il metodo proposto da Lipez (3), di fare aderire ai vetrini coproggetti la gelatina fusa, contenente i germi che si devono sviluppare, e disseccarli poscia e colorarli quando si sono sviluppati sotto forma di colonie, serve quello di Jacobi (4), che consiste nel tenere immerse le lastre di vetro colla gelatina distesa in istrato molto sottile, contenente le colonie, entro una soluzione di bicromato potassico all'un per cento, per 1-3 giorni, alla luce. In queste

(1) Günther, *Zur bacteriologischen Tecknik*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. VI, 1889, pag. 247.

(2) Gosio e Sclavo, *Contributo allo studio delle fermentazioni batteriche*, Rivista d'Igiene e Sanità pubblica, 1890, p. 451.

(3) Lipez, *Gefärbte Dauerpräparate von Deckglasculturen*, Centralblatt f. Bacteriologie Vol. I, p. 402.

(4) Jacobi, *Kleine Beiträge zur bakterioskopischen Methodik*, Ibid. 1888, Vol. III, p. 536.

condizioni la gelatina si rende insolubile, senza nulla perdere della sua trasparenza: si distacca allora dal vetro con una spatola, si lava nell'acqua per 24 ore e si tiene poscia nell'alcool a 50 % per 12-24 ore, mettendola infine nell'alcool a 70 %. La gelatina così indurita si taglia a pezzi e si colora, come se si trattasse di sezioni dei tessuti. I migliori preparati si ottengono colorando colla soluzione Löffler di azzurro di metilene, lavando nell'acqua leggermente acidulata con acido acetico, disidratando nell'alcool assoluto, rischiarando col xilolo e chiudendo infine nel balsamo. Questo metodo ha però il difetto di non riescir bene che per le culture in gelatina, giacchè per quelle fatte nell'agar, o si verifica il distacco delle colonie, se sono superficiali, oppure la decolorazione dell'agar si fa così lenta, che restano infine decolorati anche i microrganismi.

Per fare preparati di culture a sviluppo più avanzato, quali sono quelle sviluppate nei tubi da saggio, è necessario fare indurire prima la gelatina, o l'agar, come si fa pei tessuti, tagliarla col microtomo in sezioni sottili, e colorarla. L'indurimento della gelatina si può ottenere, o come ha proposto Fischl (1), ponendo il cilindro di gelatina contenente la cultura (tagliato ed estratto dal tubo mediante il foratappi) nell'alcool a 96 %, o nel miscuglio a parti uguali di alcool e di etere per 24-48 ore, oppure secondo i precetti di Neisser (2), estraendo tutto il cilindro di gelatina dal tubo, riscaldandone leggermente le pareti e facendo scivolar fuori il cilindro di gelatina, e tenendolo poscia immerso per 1-4-8 giorni (secondo il suo spessore) nella soluzione di bicromato potassico a 1 %, esposta alla luce. La gelatina, resa così insolubile, si lava per 24 ore nell'acqua e si fa indurire mettendola prima nell'alcool a 70 %, e poscia in quello a 96 %. Si taglia allora la gelatina in piccoli pezzi, in direzione trasversa o longitudinale all'asse della cultura, secondo si vuole, si fissano questi colla gomma sul sovero e si tengono per 24 ore nell'alcool assoluto.

Le sezioni si trattano coi metodi ordinarî già esposti; è bene però usare l'avvertenza di lasciarle disseccare sul portoggetti e far loro subire *in sito* i diversi trattamenti della colorazione. Il metodo di Gram semplice, o colla modificazione di Weigert, corrisponde assai bene per la colorazione di simili preparati.

Questi processi naturalmente non sono applicabili che per le specie batteriche le quali non fluidificano la gelatina. Per le altre

(1) Fischl, *Ein neues Verfahren zur Herstellung mikroskopischer Präparate aus Reagensglaskulturen*, Fortschr. d. Med, 1887, p. 663.

(2) Neisser, *Mikroskopische Schnittpräparate aus Reagensglaskulturen*, Centralblatt f. Bacteriologie, 1888, Vol. III, p. 506.

si adoperano le culture in agar; e l' agar si indurisce col bicromato potassico, come la gelatina, oppure semplicemente coll'alcool a diverso grado di concentrazione, sempre crescente, fino all' alcool assoluto. In questo stato però l'agar si taglia assai difficilmente. Per poterne fare sezioni si adopera il processo proposto da Biondi (1), che consiste nel tagliare l'agar in piccoli pezzi, impregnarli prima di olio di bergamotto e poscia di un miscuglio di quest'olio e di paraffina molle, e metterli finalmente nella paraffina pura per 24-48 ore. Le sezioni si immergono nell'olio di bergamotto, che discioglie la paraffina, da questo si passano nell'alcool, si fanno disseccare sul portoggetti e si colorano come quelle di gelatina. Anche per esse serve bene il metodo di Gram e quello di Löffler.

(1) Biondi, *Neue Methode der mikroskopischen Untersuchung des Blutes*, Arch. f. mikrosk. Anat., Vol. XXXI, 1887, p. 103.

CAPITOLO IV.

Sostanze di nutrizione e metodi di cultura.

Quando negli organi e nei tessuti degli animali ammalati è stata osservata una data specie di microrganismi, per dimostrare che sono questi veramente la causa della malattia, è necessario che sieno capaci di riprodurre, inoculati negli animali sani, la stessa forma morbosa; e perchè questa dimostrazione abbia un valore sperimentale indiscutibile, il liquido che serve per lo innesto non deve contenere che una sola specie di microbi, quella, cioè, di cui si vuol provare l'azione patogenica, senza contenere neppure sostanze organiche provenienti dai tessuti ammalati e capaci di produrre fenomeni morbosi.

Per separare i microparassiti dai prodotti patologici si era prima ricorso alla *filtrazione*, ma questo mezzo di isolamento è poco esatto, poichè insieme cogli elementi parassitarî rimangono nel filtro anche gli elementi organizzati (corpuscoli del sangue e del pus, pezzi di tessuti, ecc.).

Soltanto le *coltivazioni artificiali* permettono di isolare completamente una data specie di microrganismi, giacchè facendoli riprodurre da una prima cultura, per parecchie generazioni e col mezzo di innesti successivi, in sostanze di nutrizione sempre nuove, si deve ottenere finalmente una *cultura netta*, nella quale non si trova più nessuna traccia di quei tessuti, o materiali, da cui fu tolta primitivamente la sostanza per l'innesto.

Ottenere una data forma di microbi in cultura netta vuol dire *prendere un recipiente di vetro sterilizzato, chiuderlo con ovatta egualmente disinfettata, in modo che non permetta il passaggio dei germi, mettervi dentro una sostanza nutritiva sterilizzata, ed in questa innestare un materiale contenente quella sola specie di microrganismi che si vuol coltivare.* Per ottenere adunque una cultura isolata sono necessarie le condizioni seguenti:

1.° Il recipiente destinato a contenere la cultura dev'essere sicuramente disinfettato.

2.° Il substrato materiale deve avere una certa composizione chimica, appropriata allo sviluppo dei microbi che si vogliono coltivare, e non deve contenere neppure un germe estraneo.

3.° L'ovatta dev'essere disinfettata e deve impedire l'ingresso di germi dal di fuori.

4.° Il materiale da coltivare dev'essere puro, ossia non deve contenere che una sola specie di microbi. È questa la parte più difficile del quesito, per la quale appunto si è proposto un gran numero di processi.

5.° Finalmente, si nella prima coltura, come nelle altre successive, dev'essere impedito durante le manipolazioni l'accesso alle impurità provenienti dall'aria atmosferica.

Si è già detto in precedenza del modo di sterilizzare e di conservare sterili i recipienti per le culture. Dobbiamo ora parlare delle sostanze che si adoperano per coltivare i microrganismi, del modo di prepararle e del modo di adoperarle, sia per ottenere in cultura isolata la specie che si vuole studiare, sia per altri scopi di ricerca.

Di queste sostanze alcune sono liquide, altre solide semplicemente, ed altre infine solide e trasparenti.

1. Sostanze nutritive liquide.

Sono le prime che furono adoperate in batteriologia, e per quanto oggi non sieno più molto in uso, perchè sostituite da altre più confacienti per tali studî, tuttavia rendono sempre buoni servigi, specialmente per le osservazioni sulla biologia dei microrganismi.

Le miscele liquide, che sono state successivamente proposte per le culture, sono assai numerose; e il criterio fondamentale che ha servito per stabilirne la composizione è stato generalmente quello di riprodurre, colla maggiore fedeltà possibile, la composizione del mezzo dove si trovano in natura i microbi che si vogliono coltivare. Si è anche cercato di comporre un liquido di cultura, così detto « generale », il quale servisse, se non per tutte, almeno per la maggior parte delle specie batteriche: tali sono le miscele nutritive che portano i nomi di Cohn, di Nägeli e di Pasteur, delle quali non diamo la composizione, avendo esse oramai un interesse limitato. Pei batterî patogeni, di cui specialmente qui è parola, il liquido che meglio corrisponde al concetto dei « liquidi nutritivi generali » è il succo di carne, sotto forma di estratto acquoso, o di brodo; giacchè in questo si contiene un buon numero di costituenti chimici dei tessuti animali, nei quali appunto si sviluppano le specie parassitarie, infettanti.

a) Brodo.

Il brodo si prepara facendo bollire per $^1/_2$ ora 500 gr. di carne fresca e magra, triturata, in 1 litro d'acqua, filtrando e neutralizzando con una soluzione concentrata di carbonato o di fosfato di soda, aggiunta, a goccia a goccia, fino a reazione debolmente alcalina, dimostrata colla carta sensibile di tornasole. Si fa bollire di nuovo per 1 ora, affinchè tutti gli albuminoidi insolubili vengano precipitati, si lascia raffreddare e si filtra. Il liquido così semplicemente preparato serve bene per la cultura di molti microrganismi, come serve il brodo di pollo, usato già da tempo da Pasteur e preparato in analoga maniera.

Il liquido però che dà i migliori risultati per la cultura de batterî patogeni è il così detto *infuso di carne*, preparato secondo le norme prescritte da Löffler (1) e designato appunto generalmente col nome di « brodo di Löffler ». Si prende $^1/_2$ Kgr. di carne di bue perfettamente magra, e dopo averla triturata finamente, si mescola in un matraccio con 1 litro di acqua, lasciandola per 12-24 ore in un ambiente fresco, oppure entro una ghiacciaia nella stagione estiva. Il succo di carne che ne risulta e che contiene disciolti i materiali solubili di essa (sali, sostanze albuminoidi ed estrattive) si filtra grossolanamente attraverso la garza disposta in parecchi strati, aggiungendo al filtrato il liquido che si ottiene spremendo colle mani la pappa di carne raccolta sulla garza. In addietro si usava premere questa carne in appositi torchi; ma è questa una complicazione del processo che richiede un apparecchio di più, e che è assolutamente superflua. Al filtrato, che d'ordinario riesce minore di un litro, si aggiunge tanta acqua distillata fino a portarlo a detta misura, e vi si mescola 1 $^0/_0$ di peptone secco e $^1/_4$ $^0/_0$ di cloruro sodico, per facilitare la soluzione del peptone.

La miscela così preparata si fa cuocere per $^1/_2$ ora o $^3/_4$ d'ora nell'apparecchio a vapore di Koch, o sulla fiamma, e poscia si neutralizza, come il brodo. Si fa cuocere di nuovo per un' altra ora, finchè si sieno separate tutte le sostanze coagulabili, si lascia raffreddare e si filtra attraverso un filtro di carta bibula, bagnato con acqua.

Il liquido filtrato dev'essere perfettamente limpido, poco colorato, e fatto riscaldare non deve più intorbidarsi. Se ciò accade, come anche se appena dopo filtrato non è perfettamente trasparente, si mescola coll'intiera massa liquida un bianco d'uovo, si fa cuocere di nuovo per una mezz'ora e si filtra.

(1) Mittheil. a. d. kais. Ges. Vol. I, 1881, pag. 169.

Questo *brodo alcalino di Löffler* si distribuisce nei tubi da saggio, o nelle boccette d'Erlenmeyer, e si sterilizza per 1 ora nel vapor d'acqua entro la sterilizzatrice di Koch, ripetendo l'operzaione per 2 o 3 giorni consecutivi, oppure, per essere più sicuri della sua sterilizzazione, nell'autoclave a 120° per mezz'ora.

Se si vuole adoperare il brodo per le culture delle muffe e dei saccaromiceti, non si neutralizza, lasciando che reagisca acido.

Il potere nutritivo del brodo di Löffler può essere anche aumentato, per renderlo più adatto alla cultura di certi batterî, mediante l'aggiunta di altre sostanze, e specialmente della glicerina al 5-6 % e dello zucchero d'uva a 1-2 %. Il processo di preparazione in tali casi resta lo stesso, salvo l'aggiunta di quella data sostanza. Il brodo glicerinato serve bene, ad es., per la cultura dei bacilli tubercolari.

Petri e Maassen (1) hanno modificato alquanto il metodo di preparazione del brodo, richiamando specialmente l'attenzione sul momento della neutralizzazione, giacchè il grado di alcalinità del mezzo di nutrizione ha un'importanza notevole per lo sviluppo dei microrganismi che vi si coltivano. Il metodo da essi proposto è il seguente:

La carne, fresca e magra, triturata e mescolata con acqua distillata nella proporzione anzidetta, si lascia stare per 1 ora, e poscia si estrae per 3 ore a 60° C. circa, si fa cuocere per $^1/_2$ ora e si filtra. Dopo che si è raffreddato, si determina il grado di acidità del liquido, mediante la soluzione normale di soda, servendosi della carta sensibile azzurra di tornasole, ed anche della fenolftaleina; e ciò perchè dei fosfati contenuti nel brodo alcuni hanno reazione acida rivelabile soltanto colla tintura di tornasole, ed altri reazione alcalina, cosicchè aggiungendo al brodo una soluzione alcalina per neutralizzarlo, bisogna aggiungere di questa soluzione una quantità molto minore, se si adopera come indicatore la carta di tornasole, di quello che se si adopra come indicatore la fenolftaleina. Secondo Petri, il grado migliore di alcalinità del brodo per la grande maggioranza dei batterî sta di mezzo fra la quantità di alcali necessaria per ottenere la neutralizzazione colla carta di tornasole, e quella necessaria per la fenolftaleina; cosicchè nella preparazione ordinaria del brodo per la gelatina o per l'agar è sempre preferibile neutralizzare il brodo, valendosi della carta sensibile azzurra di tornasole, ed aggiungendo alcali finchè questa assume un colore azzurro più intenso.

(1) Petri u. Maassen, *Ueber die Bereitung der Nährbouillon für bacteriologische Zwecke*, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. VIII, 1892, pag. 311.

Dopo avere aggiunto l'alcali necessario per la neutralizzazione, o per l'alcalinizzazione del liquido, si aggiunge ancora il peptone e il cloruro di sodio, si fa cuocere il brodo per un altro quarto d'ora e si filtra ancora caldo.

Il brodo, come gli altri mezzi di nutrizione che con esso si preparano (gelatina, agar), *devono essere conservati all'oscuro*, e adoperati sempre freschi, perchè la luce e l'ossigeno diminuiscono notevolmente il loro potere nutritivo.

Il brodo, come gli altri mezzi liquidi, si deve adoperare soltanto per coltivare i microrganismi che si hanno già allo stato di purezza, giacchè, come si dirà meglio in appresso, si riesce assai difficilmente ad ottenere isolate coi mezzi liquidi le singole specie che trovansi insieme commiste.

Quando però si tratta di culture pure il brodo serve assai bene per ottenerle rapidamente sviluppate in grandi quantità, come serve bene anche quando si debbono studiare i prodotti chimici dello scambio materiale dei batterî.

Il brodo serve pure per le culture in goccie pendenti nelle camere umide di coltivazione, per osservare al microscopio le diverse fasi di sviluppo (scissione, sporificazione, germinazione delle spore) dei singoli microrganismi.

b **Latte).**

Un altro mezzo liquido di nutrizione molto importante è il latte; e questo non ha bisogno per l'uso che di essere sicuramente sterilizzato. La sterilizzazione del latte si opera nel vapor d'acqua a 100° per un'ora, ripetendo l'operazione per tre o quattro giorni consecutivi, oppure nell'autoclave a 120° C. per mezz'ora. Si può anche fare la sterilizzazione discontinua del latte col metodo di Tyndall, come pel siero di sangue.

Le culture nel latte servono specialmente per stabilire alcune proprietà caratteristiche delle specie batteriche: così di queste alcune lasciano inalterato il latte nel quale si sviluppano, mentre altre ne producono la coagulazione, accompagnata o no da produzione di acido. Anche nella maniera con cui la coagulazione si manifesta vi sono differenze secondo i diversi batterî. Tali proprietà caratteristiche dello sviluppo delle culture nel latte possono talora servire, unitamente ad altri caratteri, per stabilire il diagnostico di certe specie batteriche.

Anche il *siero di latte* può servire per le culture: in certi casi anzi, come ad es. per istudiare la produzione di acido o di alcali dei batterî, il siero di latte serve meglio del brodo. Secondo i precetti di Petrushky (1), il siero di latte si prepara aggiungendo al latte una soluzione acquosa tenue di HCl, per far precipitare la caseina, filtrando ed aggiungendo una soluzione di soda fino a reazione *esattamente neutra*. Il liquido così preparato si fa cuocere per

(1) Petrushky, *Bacteriochemische Untersuchungen*, Centralbl. f. Bacter. Vol. 6, 1889 p. 625 e 657.

2 ore nell'apparecchio a vapore di Koch, si filtra nuovamente e si sterilizza. Se la reazione è perfettamente neutra, il liquido è chiaro e trasparente, e si fa invece opaco, se si eccede nell'aggiunta di soda.

2. Sostanze nutritive solide.

Di queste, come si è detto, alcune sono semplicemente *solide, ma non trasparenti,* ed altre invece, introdotte e divulgate in batteriologia specialmente per opera di Koch, sono *solide e trasparenti.*

Appartenente alla prima categoria nominiamo anzitutto la

a) Patata.

La patata si prepara per le culture lavandola anzitutto accuratamente e soffregandola con una spazzola rude, per togliere la terra che sta fra le anfrattuosità della sua superficie; si lascia poscia immersa per un'ora circa in una soluzione di sublimato a 1 $^0/_{00}$, per uccidere le spore, assai resistenti, che vi sono quasi sempre aderenti alla superficie, si lava di nuovo con acqua abbondantemente, e si fa cuocere nella corrente di vapor d'acqua per un'ora. Questo tempo è in generale sufficiente perchè le patate si cuocano senza screpolarsi; se però sono molto grosse, si tengono nel vapor d'acqua per circa 2 ore.

Per adoperare poi la patata per le culture, secondo il metodo primitivo usato da Koch, la si prende, dopo averla lasciata raffreddare, fra il pollice e l'indice della mano sinistra, precedentemente bagnati nella soluzione di sublimato, e con appositi coltelli a lama lunga, larga e sottile, precedentemente arroventati e fatti raffreddare, si taglia in due metà, che si pongono entro una campana doppia di vetro col fondo coperto di carta bibula bagnata. Per depositare le due metà, in cui si è divisa la patata, nella campana di vetro, si stacca prima dal coltello quella inferiore e si depone, lasciando in questo tempo l'altra metà colla superficie di taglio aderente al coltello e rivolta all'ingiù; si deposita quindi anche questa e si ricopre la campana, facendo il tutto più rapidamente che si può, per impedire che cadano germi dall'aria sulle superfici di taglio. Bisogna pure avere l'avvertenza di non toccare la patata che colle dita della mano sinistra, bagnate di sublimato, e di evitare di toccare anche con queste i margini della sua superficie. Per ogni singola patata si usa un coltello recentemente sterilizzato.

In una stessa campana si possono collocare 3-4 patate, così dimezzate.

La *seminagione* o l'*innesto* (parlando di mezzi solidi è preferibile quest'ultimo termine) del materiale che contiene i microrganismi si deve fare subito dopo avere spaccato le patate: si fa prendendo col filo di platino, diritto o ripiegato ad ansa e previamente arroventato, una piccola parte di quel materiale e disegnando parecchie strie sulla superficie di taglio della patata, in modo da distribuirlo sulla maggior parte di quella, senza giungere a toccarne i margini. Questo si deve fare specialmente quando la sostanza da innesto contiene parecchie specie di microbi e si desidera separarli gli uni dagli altri, acciò che si sviluppino isolati lungo le strie disegnate dall'ago di platino. Se si ha già a che fare con un materiale puro, basterà invece deporlo strisciando leggermente sul mezzo della patata senza avvicinarsi ai bordi, giacchè è sempre da questi che comincia lo sviluppo delle impurità.

La chiusura ermetica dell'ingresso dell'aria in queste culture non è necessaria, giacchè se anche vi si deposita qualche germe, questo si sviluppa sul luogo dove cade, e si può coll'innesto successivo in un'altra patata salvare le culture, prima che sieno inquinate da altri microbi.

Questo metodo di preparare le patate per le culture, essendo semplice e spiccio, è anche oggidì comunemente adoperato, per quanto si verifichi talora l'inconveniente dell'incompleta sterilizzazione della pellicola esterna della patata, e da ciò l'invasione di quei bacilli, così detti appunto « delle patate », sulla superficie di taglio: oltre a ciò, esistendo nella campana uno spazio d'aria piuttosto grande, spesso cadono germi da questa sulle patate stesse. Ad ovviare a tali inconvenienti si sono proposti altri metodi più adatti a preparare le patate per le culture.

A tale scopo Esmarch ha proposto di togliere prima con un coltello la buccia alle patate crude, di tagliarle a fette dello spessore di circa 1 cm. e di porre ciascuna fetta entro una piccola scatola di vetro sterilizzata, facendole cuocere e sterilizzare in pari tempo entro le scatole.

Di questo metodo si sono serviti con vantaggio Soyka e Kràl (1) per conservare le culture in patata per le collezioni batteriologiche, cuocendo e sterilizzando fette rotonde di patata entro piccole scatole di vetro, aventi 5-6 cm. di diametro per 3 di altezza, con co-

(1) Soyka u Král, *Anlegung von bacteriologischen Museen.* Zeitschr. f. Hygiene Vol. 4, 1888, p. 143.

perchio a smeriglio, chiuso ermeticamente con paraffina, dopo aver fatto sviluppare le culture sulla fetta di patata.

Si può anche preparare colle patate cotte e pelate una specie di pappa, pestando le patate, mettendole entro boccette d'Erlenmeyer ed aggiungendovi acqua fino a formare una pasta densa, che si fa sterilizzare col vapor d'acqua, come al solito. A questa pasta si possono aggiungere anche altre sostanze (succo di carne, peptone, ecc.) per renderla più adatta allo sviluppo dei batterî. Questa pappa di patate serve specialmento per ottenere grandi quantità di cultura di un dato microrganismo.

Di tutti questi metodi però il migliore è quello proposto da Bolton e da Globig, e perfezionato da Roux (1), che consiste nel mettere i segmenti di patata, privi di buccia, entro tubi da saggio ordinarî (Bolton, Globig), o provvisti di uno strozzamento (Roux) nella parte inferiore (fig. 24), destinato a far sì che l'acqua che si raccoglie in fondo al tubo, dopo la cottura, non vada a contatto della patata e della cultura che vi si sviluppa. Si taglia dalla patata cruda, mediante un foratappi, un cilindro avente uno spessore un po' minore del tubo da saggio, e si divide nel senso longitudinale in tanti segmenti, i quali, posti nei tubi, si fanno in questi cuocere e sterilizzare.

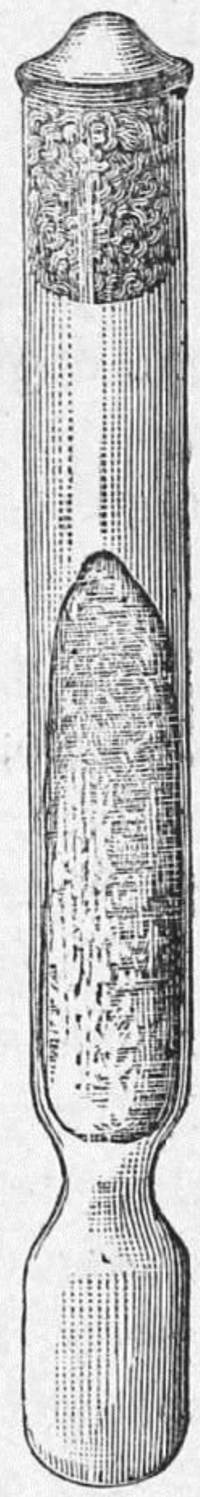


Fig. 24. — Tubo di Roux per le colture in patata.

Se si vogliono adoperare i tubi da saggio ordinarî, senza lo strozzamento proposto da Roux, si può, o come consiglia Hueppe (2), mettere in fondo al tubo un po' di ovatta che trattenga l'acqua che vi si raccoglie, oppure, come consiglia Günther, mettere in luogo dell' ovatta un pezzo di tubo di vetro, lungo 2 cm., che impedisca alla patata di toccare il fondo del tubo da saggio.

Le patate in generale non si adoperano che di rado per ottenere separate da un miscuglio diverse specie di microrganismi (culture isolanti), perchè si hanno per questo scopo mezzi migliori, ma in compenso prestano buoni servigî, e sotto molti riguardi, allorquando si tratta di un materiale puro di cultura. Difatti molti dei batterî patogeni si sviluppano sulla superficie delle patate con un aspetto caratteristico; così il bacillo del tifo vi si sviluppa sotto forma di un velamento sottile e trasparente, e quello della morva sotto forma di patina di color rosso-scuro caratteristico. Oltre a ciò le specie cromogene vi crescono rigogliose, formando colonie brillantemente colorate.

(1) Roux, *De la culture sur pomme de terre*, Annales de l'Institut Pasteur, 1888, p. 28.
(2) Hueppe, *Die Methoden der Bacterienforschung*, Wiesbaden 1891 p. 272.

Bisogna però badare al fatto che il diverso grado di reazione acida delle diverse patate può esercitare una notevole influenza sui caratteri macroscopici delle culture che vi si sviluppano. Così lo sviluppo caratteristico anzidescritto del bacillo del tifo più non si ottiene, se la reazione della patata è poco acida od alcalina come spesso succede. Lo stesso dicasi riguardo alla formazione di pigmento nelle specie cromogene.

Con tutto ciò, essendo la patata un mezzo nutritivo poco costoso e facile a prepararsi, riesce in pratica utile assai. Col succo di essa si prepara anche una gelatina speciale, come si dirà a proposito della preparazione di quest'ultima sostanza.

Un altro mezzo solido, che serve specialmente per la coltivazione degli ifomiceti, è la:

b) Pappa di pane.

Si prepara facendo disseccare a moderato calore il pane nero ordinario, tagliato a fette sottili e posto in mezzo a fogli di carta bibula, e pestandolo finamente in un mortaio ben pulito. Si pongono 10 grammi di questa polvere in una bottiglia di Erlenmeyer, vi si aggiungono 30 gr. di acqua e si fa sterilizzare per un' ora nella corrente di vapore acqueo, per due o tre giorni consecutivi. Il pane nero reagisce sempre distintamente acido, per cui serve bene specialmente per coltivare gli ifomiceti; se si usa il pane bianco, si acidifica leggermente la pappa coll'acido fosforico o col fosfato acido di soda. Si può adoperare per lo stesso scopo anche la *pappa di riso*, cotto nell'acqua.

Le *ostie* di farina di grano, bagnate e sterilizzate entro le scatole di vetro, sono state raccomandate da Schill (1) specialmente per la cultura dei batterî cromogeni.

Delle *uova*, usate senza alcuna preparazione per la cultura dei batterî, dietro proposta di Hueppe, parleremo a proposito dei metodi di cultura degli anaerobî.

I più importanti per la coltivazione dei batterî sono i mezzi di nutrizione *solidi* e *trasparenti*, dei quali il primo rappresentante è la

c) Gelatina ed agar nutritiva.

È merito grandissimo di Koch lo aver pensato di rendere solidi alla temperatura ordinaria tutti i liquidi, già prima usati per la coltivazione dei microrganismi, mediante l'aggiunta di una certa quantità di gelatina, o còlla di pesce ordinaria, in modo da tra-

(1) Centralbl. f. Bacteriologie, 1889, vol. V, p. 346.

sformarli in altrettanti mezzi di nutrizione solidi e trasparenti. Si possono avere così varie specie di gelatina nutritiva, composte dai diversi infusi o decotti vegetali, ognuna delle quali può essere specialmente adatta allo sviluppo di certe specie di microbi. Koch ha cercato però di comporre anche un substrato materiale che servisse, se non per tutti, almeno per la maggior parte dei batterî, ed ha trovato che quello che meglio di ogni altro corrisponde allo scopo è l'*infuso di carne con peptone, a cui si aggiunge la gelatina in proporzione variabile dal* 5 *al* 10 %.

La gelatina, aggiunta al brodo o ad altri liquidi in questa proporzione, si rigonfia e si discioglie ad una temperatura di circa 30° C., formando un liquido chiaro e trasparente, che si mantiene fluido finchè la temperatura è superiore od uguale a 24-25° C.; al disotto di questo punto la gelatina si trasforma in una massa solida e trasparente, che si conserva tale per un tempo indefinito, purchè se ne impedisca il disseccamento.

La gelatina adunque può essere adoperata liquida o solida, a nostro piacimento; e questo, come vedremo, è di grandissimo vantaggio per certe operazioni batteriologiche. I particolari relativi alla preparazione della gelatina nutritiva, quale si adopera ordinariamente per le culture, sono i seguenti:

Si prepara dapprima l'infuso di carne, secondo i precetti di Löffler, fermandosi al punto in cui al succo di carne filtrato, non ancora riscaldato, si è aggiunto 1 % di peptone e 0,5 % di sal di cucina. Vi si aggiunge allora la gelatina in fogli, della marca più fina che si trova in commercio, in proporzione dell'8-10 %, avvertendo che nella stagione estiva giova sempre attenersi alla proporzione del 10%, perchè la gelatina resti consistente anche quando nell'ambiente dove si lavora havvi una temperatura vicina a quella sua di fusione.

Si agita il miscuglio in un grosso matraccio di vetro, e si riscalda a bagno maria ad una temperatura non molto alta, finchè la gelatina si è sciolta, senza *produrre la coagulazione degli albuminoidi* del succo di carne. Questo miscuglio, che reagisce fortemente acido, si neutralizza colle stesse regole dette pel brodo, fino a che la reazione, saggiata colle carte di tornasole, si mostra debolmente alcalina. Dopo neutralizzato, si fa cuocere per 1 ora nella corrente di vapor d'acqua, perchè precipitino gli albuminoidi, e poscia si filtra attraverso carta bibula bagnata.

Se si ha l'avvertenza di filtrarla frazionatamente in un piccolo imbuto, la gelatina filtra tutta prima di raffreddarsi, senza che vi sia bisogno di adoperare l'imbuto a doppia parete con acqua calda,

generalmente noto. Tutt'al più, se la gelatina si condensa, si può con una fiamma di gas riscaldare di quando in quando, leggermente, la superficie esterna dell'imbuto di vetro. Si avrà l'avvertenza di coprire questo con una lastra di vetro durante la filtrazione, sia per impedire che sulla gelatina si depositino germi dall'aria, e sia specialmente per limitarne l'evaporazione e il raffreddamento.

La gelatina prima filtrata, la quale dev' essere perfettamente chiara e trasparente, deve subito venir sottoposta ad alcune prove di controllo, per risparmiare poscia di doverla di nuovo filtrare per intiero, qualora non sia convenientemente preparata. Bisogna, cioè, anzitutto verificare se tutti quanti gli albuminoidi coagulabili sono realmente precipitati colla prima cottura; altrimenti, quando in seguito la gelatina si riscalda di nuovo, come deve farsi per isterilizzarla, diventa torbida. Per compiere una tale verifica, si raccoglie in un tubo da saggio la prima gelatina filtrata e si fa bollire direttamente sulla fiamma; se resta trasparente, segno è che non vi è più traccia di sostanze coagulabili col calore, e se invece si intorbida, bisogna farla bollire, come la prima volta, per un'altra mezz'ora almeno, e poscia filtrarla.

L'altra prova da farsi nella gelatina prima filtrata è quella di verificare se la reazione si è mantenuta egualmente alcalina, come era prima della cottura; giacchè talvolta accade che alcuni acidi, resi liberi durante il riscaldamento, rendono di nuovo acido il miscuglio. In quest'ultimo caso, prima di andare innanzi nella filtrazione, è necessario aggiungere ancora un poco di soluzione di soda, far cuocere per un quarto d'ora e poscia filtrare. Se la gelatina è preparata come si deve, dopo filtrata dev' essere limpida e trasparente come l'acqua, colorata in giallo, non molto intensamente, e non deve più intorbidarsi nelle successive cotture che deve subire per la sua sterilizzazione.

Talora però succede che, malgrado si trovi tutto in perfetta regola colle condizioni suesposte, la gelatina tuttavia filtra leggermente opaca e si mantiene tale, anche se si filtra di nuovo attraverso un filtro doppio di carta, per cause non ancora ben precisate. In tal caso, aggiungendo ad ogni litro di gelatina l'albume di uno o di due uova, mescolandolo bene insieme con essa e facendo poscia cuocere il miscuglio per un'altra mezz'ora, l'albume che coagula, precipitando in fiocchi, trascina seco quelle particelle sospese che producevano l'intorbidamento, cosicchè colla successiva filtrazione si ottiene la gelatina chiara e trasparente.

È bene anzi introdurre costantemente quest'aggiunta nel processo di preparazione della gelatina, per evitare eventuali lungag-

gini; e quindi, dopo di avere alcalinizzato e fatto cuocere il miscuglio, come si è detto, si lascia raffreddare fino ad una temperatura inferiore ai 50° C., e vi si aggiunge l'albume d'uovo, sbattuto insieme con un volume doppio di acqua fredda, mescolandolo accuratamente colla gelatina. Si fa cuocere nuovamente per 20 minuti e si filtra.

Abbiamo descritto finora il metodo di preparazione della gelatina, il quale, giusta anche l'esperienza personale, ci è sembrato più spedito e corretto ad un tempo. Sono molte però le varianti che si sono proposte, specialmente per rendere il processo in alcune parti più esatto.

Così, invece di aggiungere la gelatina e gli altri ingredienti al succo di carne, Schultz (1) consiglia di preparare prima il succo di carne con peptone e sal di cucina, far cuocere, filtrare, neutralizzare, filtrare nuovamente e finalmente aggiungere al brodo limpido la gelatina, badando ad aggiungere nella neutralizzazione un piccolo eccesso di alcali, che serva a neutralizzare il debole grado di reazione acida che ha la gelatina. Schultz consiglia pure di servirsi della fenolftaleina come indicatore per la neutralizzazione del brodo, il che invece, secondo Petri, non sarebbe esatto.

Nella preparazione della gelatina, come in quella del brodo, il momento più importante è quello della sua *neutralizzazione*, od *alcalinizzazione*, perchè certi batterî sono molto sensibili al grado di reazione alcalina del mezzo nutritivo. È quindi buon precetto titolare sempre esattamente il grado di acidità del miscuglio, prendendo di questo 10 cc. ed aggiungendo ad esso la soluzione di soda normale a $^1/_{10}$, finchè la cartolina sensibile azzurra di tornasole, immersa nel liquido, comincia ad assumere un colore più intenso: si calcola allora la quantità di alcali che bisogna aggiungere a tutto quanto il miscuglio (1 litro) per neutralizzarlo esattamente, aggiungendolo però sotto forma di soluzione più concentrata, per non aggiungere troppa acqua. Fatto ciò, si può ancora aggiungere, quando occorre, quel tanto per cento di alcali che è più conveniente.

Non di rado infatti interessa dare alla gelatina un determinato grado di alcalinità, per favorire lo sviluppo di certi microrganismi. Così per quelli delle acque si è trovato che è necessario un grado di alcalinità maggiore di quello che possiede la gelatina leggermente alcalina, comunemente adoperata nei laboratorî: lo stesso è necessario anche per la coltivazione dei bacilli del colèra. Faccio notare però, a questo proposito, che allorquando si vuol dare alla gelatina un grado di alcalinità maggiore di quello ordinario, bisogna adoperare il carbonato e non l'idrato sodico, perchè quest'ultimo, giusta la mia esperienza, aggiunto alla gelatina in una certa quantità, toglie ad essa la facoltà di restar solida al disotto di 24° C.

(1) Schultz, *Zur Frage von der Bereitung einiger Nährsubstrate,* Centralblatt. f. Bacteriologie, Vol. X, 1891, pag. 52.

Preparata così la gelatina, prima di adoperarla per le culture deve ancora essere sterilizzata. Per far ciò, o si distribuisce prima nei tubi da saggio, chiusi con ovatta e sterilizzati, in proporzione di 10 cc. circa per tubo, oppure, se non si deve adoperare tutta in breve tempo, per evitare che nei tubi, svaporando l'acqua, la gelatina si dissecchi e diventi meno adatta allo sviluppo dei batterî, è preferibile distribuirla soltanto in parte, e mettere il resto entro altrettante boccette di Erlenmeyer della capacità di 100-200 cc..

La sterilizzazione della gelatina colla corrente di vapor d'acqua non si può fare in una volta sola, perchè se *si tiene troppo a lungo alla temperatura di* 100° C., *o perde totalmente la facoltà di coagulare o coagula imperfettamente.* È preferibile perciò fare per la gelatina una specie di sterilizzazione discontinua, tenendola nella corrente di vapor d'acqua, o nell'acqua bollente di un bagno maria, 15-20 minuti per volta per 3-4 giorni consecutivi. Si può però anche sterilizzarla in una volta sola nell'autoclave, tenendola a 120° C. per 10-15 minuti.

Quando la sterilizzazione si fa nell'apparecchio di Koch, non bisogna dimenticare l'avvertenza di introdurre in esso la gelatina soltanto quando l'acqua è già in ebollizione, e di estrarnela subito dopo trascorso il tempo suindicato per la sterilizzazione; se si lascia nell'apparecchio finchè questo si è raffreddato, come fa spesso chi è poco pratico di tali manipolazioni, sovente accade che la gelatina non diventa più solida completamente.

Una volta compiuta la sterilizzazione, si chiudono le boccette d'Erlenmeyer con una calotta di gomma elastica, oppure se ne copre di paraffina l'orificio chiuso dal tappo d'ovatta, sia per impedire che evaporando l'acqua la gelatina si dissecchi, comep er tener lontani i germi dell' aria. Quando si vuole adoperare la gelatina si distribuisce nei tubi da saggio, e questi si fanno sterilizzare ancora una volta per un quarto d'ora nella corrente di vapor d'acqua. Nel versare la gelatina entro i tubi bisogna badare a che la parte superiore del tubo, che dev'essere chiusa coll'ovatta, non resti bagnata dalla gelatina; altrimenti, allorquando si toglie il turacciolo per introdurre l'ago di platino che porta il materiale di cultura, questo urta nei fili di cotone che restano attaccati al tubo, e vi può lasciare aderente quel materiale che deve appunto essere portato nella gelatina per le culture.

Per ottenere un tale intento serve bene un apparecchio semplicissimo, formato da un imbuto di vetro, a cui si è aggiunto, mediante un tubo di gomma lungo 10 cm. circa, un pezzo di tubo di vetro che termini a punta sottile. Si applica nel tubo di gomma

una pinza a pressione, si versa nell'imbuto la gelatina che si vuol distribuire, e la si raccoglie nella quantità voluta entro i tubi, nei quali si fa penetrare la punta del tubo di vetro annesso all'imbuto, aprendo e chiudendo colla pinza il passaggio alla gelatina. In questo modo si realizza non solo il vantaggio di non imbrattare l'orificio dei tubi, ma anche l'altro di potere una sola persona compiere l'operazione del riempimento dei tubi.

Havvi anche un apparecchio speciale proposto da Treskow (1) per misurare esattamente i 10 cc. di gelatina che si distribuiscono nei tubi, ma rinunciamo a descriverlo, perchè ci pare un apparecchio di lusso e poco importante.

I tubi, sterilizzati come sopra si è detto, si conservano nelle cestine di fil di ferro, o meglio entro un recipiente di vetro chiuso da coperchio per limitare l'evaporazione, e si tengono all'oscuro.

Riepilogando, il processo di preparazione della gelatina nutritiva ordinaria consta dei seguenti momenti:

1.° Preparazione dell'infuso di carne (Löffler).

2.° Aggiunta del peptone (1 %), del sale di cucina (0, 5 %) e della gelatina (8-10 %).

3.° Fusione della massa a circa 50° C., e neutralizzazione (o alcalinizzazione).

4.° Cottura per un'ora, aggiunta dell'albume d'uovo (a 50° C.) e cottura per altri 20 minuti.

5.° Filtrazione e sterilizzazione discontinua (nei tubi da saggio o nelle boccette d'Erlenmeyer) per 15-20 minuti nel vapor d'acqua, per 3-4 giorni consecutivi.

Quando si dice semplicemente « gelatina nutritiva », si intende parlare della gelatina preparata nel modo anzidetto, come si adopera comunemente per le culture. Si preparano però, a scopi speciali, anche altre varietà di gelatina, sia prendendo per base della loro preparazione, invece del brodo, altri liquidi, come sarebbero gli *estratti di carne* aggiunti all'acqua in proporzione di 1 a 5 %, oppure l'urina, il siero di latte, il siero di sangue, ecc., sia aggiungendo alla gelatina comune sostanze di varia natura. Di queste le più comunemente adoperate sono la glicerina, la destriua e il glucosio; le prime due si aggiungono nella proporzione del 4-6 %, nello scopo di render la gelatina più adatta allo sviluppo di alcuni microrganismi, e il glucosio si aggiunge in proporzione di $^1/_2$-3 %, sia per aumentare semplicemente il potere nutritivo della gelatina, sia per renderla maggiormente adatta allo sviluppo degli anaerobî, giac-

(1) Repertorium der analytischen Chemie, 1887.

chè il glucosio, come sostanza riducente, favorisce la loro moltiplicazione. Per lo stesso scopo si aggiungono alla gelatina anche altre sostanze avide d'ossigeno, come sono il solfoindigotato di soda (carmino d'indaco), il formiato di soda e la resorcina.

Un'altra varietà speciale di gelatina è quella così detta « al succo di patata », proposta da Holz (1) per la coltivazione dei bacilli del tifo. Si tagliuzzano finamente le patate crude, sbucciate, e se ne spreme il succo attraverso un pannolino, lasciandolo sedimentare per 24 ore a 10° C. Dopo di ciò si filtra, si fa cuocere per mezz'ora nella corrente di vapore, si filtra di nuovo e vi si aggiunge il 10 % di gelatina. Si fa cuocere di nuovo per $^3/_4$ d'ora e si filtra. La gelatina così preparata ha un colorito brunastro ed ha reazione distintamente acida.

Altre sostanze si aggiungono alla gelatina, nello scopo di mettere in evidenza alcune proprietà biologiche dei microrganismi, quali sono il loro potere ossidante, o riducente, e la produzione di acido, o di alcali, che ha luogo pel loro sviluppo. A tal uopo si preparano specialmente le così dette *gelatine colorate*, ed è mediante la modificazione o la scomparsa del colore aggiunto che si mettono in rilievo le proprietà anzidette dei microrganismi. Una delle sostanze più adoperate per ciò è la soluzione di *laccamuffa*, la quale serve non solo a porre in evidenza la produzione di acido o di alcali per opera dei batterî, ma serve anche per studiare i processi di riduzione che possono aver luogo (Cahen (2)) nel substrato nutritivo; giacchè la laccamuffa si decolora per opera di quei processi, e se vien posta di nuovo in presenza dell'ossigeno, riacquista il suo colore primitivo. Quest'ultimo fatto può però disturbare l'osservazione del cangiamento di reazione per mezzo della laccamuffa; cosicchè, se la si vuole adoperare soltanto per questo ultimo scopo, per constatare, cioè, la formazione di acido o di alcali per opera dei batterî, bisogna scegliere un mezzo nutritivo poco adatto pei fenomeni di riduzione, e questo mezzo, secondo Petruschky, sarebbe il siero di latte, ottenuto colla precipitazione della caseina dal latte fresco. Pei particolari relativi alla preparazione di questo mezzo colorato rimandiamo il lettore al lavoro originale di Petruschky (3).

Per constatare in ispecial modo la produzione di acido nelle culture, Beyerinck (4) ha proposto di aggiungere alla gelatina e all'agar la creta finamente polverata e sospesa nell'acqua, oppure i carbonati di zinco, di magnesio o di bario fino a rendere il mezzo lattiginoso ed opaco. Attorno alle colonie dei batterî produttori di acido si forma una zona chiara e trasparente, dovuta al fatto della decomposizione del carbonato.

Per mettere in rilievo il potere riducente serve anche il carmino d'indaco, il quale si decolora come la laccamuffa, oppure alcune sostanze coloranti di anilina, ra le quali specialmente il turchino di metilene e la cianina.

Nöggerath (5) ha proposto un miscuglio di varie sostanze coloranti d'a-

(1) Zeitschrift für Hygiene, Vol. VIII, pag. 159.

(2) Cahen, *Ueber das Reductionsvermögen der Bacterien*, Zeitschr. f. Hygiene Vol. 2, 1889, pag. 386.

(3) Petruschky, *Die Farbenreaktion bakterieller Stoffwechselprodukte auf Lakmus*, ecc. Centralblatt f. Bakteriologie, Vol. 6, 1889, pag. 625 e 657.

(4) Beyerinck, *Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien*, Centralblatt f. Bakteriologie, Vol. 9, 1891, pag. 781.

(5) Fortschritte d. Medicin, Vol. VI, 1888.

nilina, il quale aggiunto alla gelatina le impartisce un colore, che viene variamente modificato dallo sviluppo dei diversi batterî, e che potrebbe perciò essere usato, secondo lui, per stabilire un criterio differenziale fra alcune specie di essi. Le previsioni di Nöggerath non sono però state confermate, per cui è preferibile, anche perchè più semplice, di usare una sola sostanza colorante.

Nell'adoperare i colori d'anilina non bisogna mai dimenticare che essi sono dotati di un notevole potere antisettico, e che bisogna quindi aggiungerli alla gelatina (come agli altri mezzi nutritivi) in piccolissima proporzione. Per preparare la gelatina colorata si suole allestire prima la soluzione colorante, tenue, nell'acqua distillata, ed aggiungerla poscia, a goccia, a goccia alla gelatina liquefatta, fino al grado voluto di colorazione.

La gelatina offre grandi vantaggi per le culture dei batterî, ma ha pur essa i suoi inconvenienti; e il principale si è che, diventando liquida a circa 30° C., allorquando si dovesse adoperare per la coltivazione di quei batterî, e dei patogeni ve ne sono molti, i quali non si sviluppano che ad una temperatura superiore a quella ora indicata, prossima, cioè, a quella del nostro corpo, la gelatina perderebbe il suo vantaggio principale di mezzo solido. Un altro inconveniente si ha pure in ciò, che molti microrganismi producono un fermento peptonizzante, che fluidifica la gelatina, la quale in tal modo presto si altera, diventando completamente liquida.

A questi inconvenienti della gelatina supplisce bene un'altra sostanza, capace come quella di trasformare le miscele liquide nutritive in mezzi solidi e trasparenti, e questa sostanza è l'*agar* (*agar-agar* dei tedeschi, *gelose* dei francesi).

È questa una gelatina d'origine vegetale, non appartenente agli albuminoidi come la gelatina animale, ma sibbene agli idrati di carbonio, che si estrae da diverse specie di alghe marine delle coste indiane e giapponesi, e viene messa in commercio sotto forma di listerelle secche ed opache, o sotto forma di polvere. L'agar nutritiva si prepara come la gelatina; si aggiunge quindi al brodo di Löffler, o di Petri, l'agar del commercio (se in listerelle, tagliata in piccoli pezzi) in proporzione di 1 $^1/_2$-2 $^0/_0$, non di più, giacchè se è in quantità maggiore, la filtrazione, che è già difficile nella misura sopradetta, diverrebbe estremamente lunga, senza alcun vantaggio.

Alcuni consigliano di aggiungere l'agar al brodo con peptone e sal di cucina, cotto e filtrato, perchè riesca più facile la filtrazione, mentre altri, per risparmio di tempo, consigliano invece di mescolare all'infuso di carne l'agar cogli altri ingredienti, e poscia cuocere e filtrare. È da preferirsi quest'ultimo sistema, anche perchè in tal modo l'agar si discioglie più facilmente e più completamente, mentre si può anche ovviare all'inconveniente dell'ostacolata filtrazione, causata dai cenci di sostanze albuminoidi precipitate, fil-

trando una prima volta, grossolanamente, l'agar dopo la cottura attraverso la garza, e filtrandola poscia di nuovo dopo la neutralizzazione in maniera completa. In qualunque modo si proceda, si deve lasciar rigonfiare l'agar nel liquido per qualche ora, prima di cuocerla, e tenerla poscia nell'acqua bollente del bagno maria o nella corrente di vapor d'acqua per 5-6 ore, e non di meno, se si vuole che l'agar si sciolga bene e filtri chiara e trasparente.

Per quest'ultimo scopo si è anche proposto di ricorrere a speciali espedienti, come è quello di lasciare prima rigonfiare per 5 minuti l'agar nell'acqua acidulata con HCl 2 % (Schottelius) (1), o con acido acetico (5 %), lavarla bene con acqua, aggiungerla al brodo e cuocerla come d'ordinario. Io non saprei consigliare un tale procedimento, che non fa che complicare il processo di preparazione dell'agar, già di per sè abbastanza lungo; giacchè se si ha l'avvertenza di farla cuocere abbastanza e di filtrarla come ora si dirà, l'agar si ottiene egualmente chiara come col trattamento ora accennato.

Dopo la cottura e dopo la filtrazione grossolana attraverso la garza, si procede alla neutralizzazione; oppure, se si è usato il brodo già neutralizzato in precedenza, si saggia di nuovo la reazione colla carta di tornasole, per aggiungere ancora qualche goccia di soluzione di soda, come in generale è necessario perchè il liquido reagisca debolmente, ma distintamente alcalino. Si fa cuocere di nuovo per 1 ora, aggiungendovi prima un albume d'uovo, come per la gelatina, e poscia si filtra.

Questo è il momento più difficile e più tedioso dell'operazione, perchè la filtrazione dell'agar attraverso la carta da filtro, anche a temperatura elevata, si compie sempre assai lentamente. È per ciò che sono stati proposti espedienti di vario genere per agevolarne la filtrazione, ed alcuni consigliano persino di tralasciare affatto quest'operazione e fare semplicemente sedimentare l'agar disciolta, mantenendola ad una temperatura superiore ai 50° C. Quando si voglia far ciò, si versa l'agar entro cilindri di vetro piuttosto alti e stretti, e si lascia sedimentare entro l'apparecchio di Koch, fino a che è addivenuta ben chiara; si raccoglie allora mediante pipette la parte superiore chiarificata, e si distribuisce nei tubi o nelle boccette d'Erlenmeyer sterilizzate, come si è detto per la gelatina. In tal modo però va perduta una parte di sostanza non indifferente.

La filtrazione dell'agar si fa attraverso la carta, oppure attraverso l'ovatta o il cotone di vetro. Per filtrare attraverso la carta, bisogna badare di bagnare prima il filtro con acqua distil-

(1) Centralbl. f. Bakteriologie, 1887, Vol. II, p. 100

lata bollente, e non con acqua fredda, altrimenti si deposita sulla superficie del filtro uno strato di agar solida, che impedisce l'avviarsi della filtrazione. Hueppe consiglia, perchè l'agar filtri più chiara, di mettere nell'imbuto un filtro doppio di carta non pieghettata, e di riempirlo a metà colla bambagia, o col cotone di vetro La filtrazione deve farsi nell'imbuto ad acqua calda, oppure mettendo il recipiente dove si raccoglie il filtrato, insieme col filtro, entro l'apparecchio a vapore di Koch.

La filtrazione attraverso la carta è però un'operazione estremamente lunga e noiosa, per quanto l'agar filtri più chiara che non attraverso la bambagia, dove filtra invece più rapidamente.

Si è proposto perciò di accelerare la filtrazione mediante la pressione.

Gli apparecchi che servono a tale scopo non sono molto costosi, e pel risparmio di tempo ed anche di spesa, necessaria pel gas che deve riscaldare per parecchie ore l'imbuto ad acqua calda, o l'apparecchio di Koch, non li potrei raccomandare abbastanza. Il più semplice è quello proposto da Karlinski (1), il quale consiste in un cilindro a doppia parete, che può essere fatto di ferro zincato, o meglio di rame stagnato, il cui spazio interno è chiuso ermeticamente da un coperchio a vite attraversato da un tubo, in cui si innesta il tubo di gomma di una doppia palla da polverizzatore, destinata a comprimere l'aria nell'interno del cilindro. Il fondo di questo è attraversato da un altro tubo munito di rubinetto, destinato all'escita dell'agar che filtra, la quale si raccoglie in un matraccio sottostante (Fig. 25).

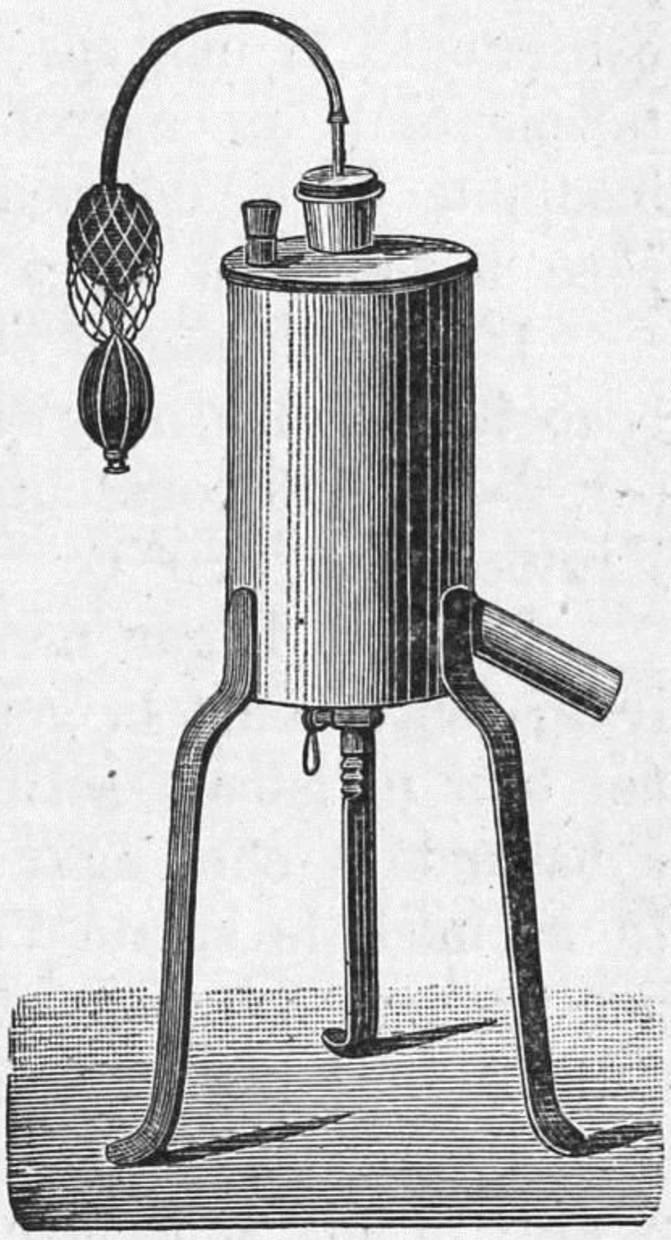


Fig. 25. — Apparecchio per la filtrazione dell'agar.

Lo spazio interparietale contiene l'acqua, che si riscalda mediante un'appendice laterale, sotto la quale si tiene una fiamma di gas. Nel cilindro interno, verso il terzo inferiore, havvi un cercine metallico che indica l'altezza che deve raggiungere lo strato filtrante di cotone idrofilo, che si introduce in esso, pigiandolo colle mani perchè resti compatto e aderente alle pareti. Per fare agire l'apparecchio, si riscalda l'acqua dello spazio interparietale fin quasi all'ebollizione, si bagna l'ovatta con acqua distillata bol-

(1) Centralblatt f. Bakteriologie, 1890, Vol. 8, p. 643.

lente, si chiude, e facendo agire la palla di gomma, si caccia via tutta l'acqua che impregnava l' ovatta. Si versa allora l'agar nell'apparecchio e si filtra a *moderata pressione*.

In pochi minuti si ottiene così filtrato e chiaro un litro di liquido. Nell'esperienza che ho fatto di questo apparecchio, ho potuto vedere però che, per avere un'agar chiara e trasparente, come colla filtrazione attraverso la carta, è necessario farla passare attraverso il cotone per 2-3 volte consecutive, avendo anche l'avvertenza, prima di versarla sul filtro nelle volte successive, di avvicinare con una bacchetta di vetro il cotone alle pareti del recipiente, dalle quali viene distaccato dall'aria durante la filtrazione. Con tutto ciò l'operazione della filtrazione di 1 litro d'agar *non oltrepassa i* 15-20 *minuti*, cosicchè risulta chiaro il grande vantaggio che offre questo semplice apparecchio.

Unna (1) ha proposto, per lo stesso scopo, di valersi della pressione del vapore che si svolge racchiuso entro un apparecchio, consistente in una specie di imbuto a doppia parete chiuso ermeticamente da un coperchio metallico. Entrando l'acqua in ebollizione mediante il riscaldamento dell'appendice laterale dell'imbuto, il vapore si condensa sopra l'agar e la spinge attraverso il filtro.

L'agar filtrata si sterilizza distribuita nei tubi da saggio o nelle boccette d'Erlenmeyer, tenendola nel vapor d'acqua per mezz'ora per 2-3 giorni consecutivi, oppure una volta sola per mezz'ora nell'autoclave a 120° C.

Siccome l'agar non si ottiene mai così perfettamente chiara e trasparente come la gelatina, così per lo più si lascia solidificare nei tubi in istrato sottile, mantenendo questi in posizione obliqua, e badando a che l'agar non arrivi a toccare il turacciolo di cotone. In tal modo lo strato d'agar riesce trasparente più che a sufficienza, per lasciare scorgere attraverso di esso le particolarità di sviluppo delle colonie che crescono sulla sua superficie. Lasciando raffreddare l'agar nei tubi nella maniera anzidetta, oltre ai vantaggi già esposti di una superficie più estesa per le culture e di una maggior trasparenza, si ha pure quello che durante il raffreddamento l'agar spreme fuori un po' d'acqua, la quale si raccoglie in fondo del tubo e serve a mantenere umida la superficie del mezzo nutritivo.

Questo fatto, però, ha in pari tempo l'inconveniente, che l'acqua che si separa dall'agar impedisce sovente a questa di aderire al vetro; cosicchè, allorquando i tubi raffreddati si pongono in posi-

(1) Unna, *Der Dampftrichter*, Centralbl. f. Bakter. 1891, Vol. 9, p. 749.

zione verticale, l'agar si accartoccia in fondo del tubo. Per evitare questo inconveniente, Esmarch (1) ha proposto di aggiungere all'agar 1 % di gomma arabica. Si può anche riuscire egualmente nell'intento, aggiungendo, invece della gomma, una piccola quantità di gelatina.

L'agar così preparata resta solida fino a circa 40° C., e soltanto al di sopra di questa temperatura comincia a diventare molle; ma per averla completamente sciolta è necessario riscaldarla almeno a 90° C. L'agar ha quindi sulla gelatina il vantaggio di servire anche per coltivare i batterî a temperature prossime a quella del corpo, ed ha inoltre quello di non venire disciolta dai microrganismi produttori di fermento peptonizzante. Di fronte a ciò ha lo svantaggio di non essere così perfettamente limpida, come la gelatina, e di essere di maneggio difficile per certe operazioni batteriologiche, specialmente per quella delle culture isolanti, appunto perchè è necessario riscaldarla fortemente perchè si mantenga liquida, e alcuni batterî possono quindi essere uccisi dal calore; per cui, essendo necessario adoperarla ad una temperatura vicina a quella in cui si solidifica (40° C.), facilmente si raffredda e si rapprende in una massa non perfettamente fluida, che non si estende in istrato sottile, così bene come la gelatina.

Per compensare allora i difetti di ambedue queste sostanze si è pensato, con felice idea, di combinarle insieme nello stesso mezzo, in proporzione variabile, in modo da ottenere sostanze capaci di diventar solide a gradi di temperatura intermedî fra 25° e 40° C. La combinazione più adatta per l'uso ordinario è quella del 5 % di gelatina e di 0,95 % di agar, preparata in modo che si aggiungono prima ad 1 litro di brodo di Löffler 50 gr. di gelatina, si fa sciogliere, si alcalinizza e poscia si aggiunge l'agar, che si fa rigonfiare e cuocere per 1 ora soltanto, come la gelatina semplice. Si può anche preparare a parte la gelatina e l'agar, e poscia mescolarle insieme. In tal guisa si ottiene un mezzo di nutrizione perfettamente chiaro, che fonde a temperatura più bassa che l'agar, e che si può quindi adoperare più agevolmente per le culture isolanti, pur restando solido fra 30° e 40° C.

Questa « agar-gelatina » è adunque un mezzo nutritivo che offre grandi vantaggi sull'agar e sulla gelatina semplice, e che anzi ritengo sia destinato a rimpiazzarle nell'uso comune.

Come nella gelatina, anche nell'agar si aggiungono talvolta altre sostanze, quali il glucosio e la glicerina, per aumentarne

(1) Zeitschr. f. Hyg. Vol. I, p. 301.

il potere nutritivo: l'aggiunta della glicerina all'agar, in proporzione del 5-6 %, è assai importante, giacchè in tal modo, come hanno trovato Roux e Nocard, si rende l'agar bene adatta allo sviluppo del bacillo della tubercolosi, mentre senza tale aggiunta non lo è che pochissimo. Anche all'agar si possono mescolare le stesse sostanze che si è detto per la gelatina, nello scopo di mettere in rilievo certe proprietà biologiche dei batterî (potere ossidante o riducente, produzione di acido o di alcali).

Invece dell'agar si può adoperare con eguale, ed anche con maggior vantaggio, per la coltivazione di certi batterî che vivono a temperature molto elevate (50°-70° C.), il *musco d'Irlanda* (*Fucus crispus*), il quale si trova in vendita nelle farmacie.

Questa sostanza, se viene disciolta nei liquidi in proporzione del $2^1/_2$-3%, impartisce a questi la proprietà di restar solidi ad una temperatura press' a poco uguale a quella dell'agar, e se si aggiunge in proporzione maggiori, 6-7%, li fa restare solidi anche alla temperatura di 60°-70° C., rendendoli così adatti per la cultura dei microrganismi, così detti *termofili*, i quali vivono e si sviluppano ad alta temperatura. Ha però l'inconveniente di sciogliersi con molta difficoltà e di filtrare assai più lentamente dell'agar, specialmente se in forte proporzione. E difatti i metodi di preparazione della gelatina di fucus, colla filtrazione attraverso flanella, come vennero descritti da Miquel e da Edington, i quali per primi ne hanno consigliato l'uso batteriologico, sono assai lunghi e malagevoli da eseguirsi, ragione per cui questa sostanza, per quanto facile ad aversi e di poco prezzo, è stata finora poco adoperata.

Puccinelli (1) invece ha provato che si può la gelatina di fucus ottenere in modo semplice e rapido, aggiungendo la sostanza, lavata precedentemente in acqua bollita, al brodo alcalino in proporzione dal 3%, facendola bollire per 1 ora a bagno maria, o nella corrente di vapor d'acqua, e filtrando in un filtro di carta ordinario, nell'imbuto ad acqua calda. Per quanto il musco non resti tutto disciolto, pure il liquido filtrato, chiaro e trasparente, come la gelatina ordinaria, ha la proprietà di restar solido alla stessa temperatura dell'agar. Aumentando la proporzione del musco (5-6%) è necessario far bollire un tempo più lungo, e la filtrazione è corrispondentemente più difficile. A tale inconveniente si può però agevolmente riparare, filtrando coll'apparecchio di Karlinski, già descritto, attraverso il quale la gelatina di fucus filtra bene, come quella di agar. Nella gelatina di fucus i batterî patogeni si svi-

(1) Puccinelli, *Il « fucus crispus » nella preparazione dei terreni nutritivi dei batterî*, Bullettino dell'Accad. med. di Roma, 1889-90, Fasc. V.

luppano altrettanto bene che nell'agar: in essa si ottiene rigoglioso anche lo sviluppo del bacillo della tubercolosi.

d) Siero del sangne.

Un'altra sostanza di nutrizione, solida e trasparente, molto adatta per lo sviluppo dei microrganismi patogeni, è il siero del sangue, sterilizzato e fatto solidificare ad una temperatura un po' inferiore a quella che corrisponde al punto di coagulazione di questa sostanza.

Fu Koch che scoperse per primo la particolare proprietà che ha il siero sanguigno di mantenere inalterata la sua trasparenza, quando lo si faccia solidificare lentamente ad una data temperatura; ed egli la pose subito a profitto, per preparare un mezzo di nutrizione assai confaciente per le condizioni speciali che richiede lo sviluppo dei microparassiti.

Per avere il siero, bisogna anzitutto raccogliere il sangue dall'animale, il che si può fare in due modi: o prendendolo dagli animali che si uccidono nei pubblici macelli, secondo il metodo primitivo di Koch, ed in tal caso naturalmente il siero che se ne separa non può essere batteriologicamente puro, ed è necessario perciò di sterilizzarlo; oppure si raccoglie il sangue colle cautele necessarie per ottenere un siero assolutamente sterile, ed allora non resta che a farlo solidificare, come fu detto.

Nel primo caso, che è il più comune, per raccogliere il sangue si adoperano recipienti di vetro cilindrici, chiusi con tappo smerigliato, puliti meccanicamente e lavati poscia con una soluzione calda di soda, i quali contengano almeno 2 litri di liquido. Quando si può, si fanno tagliare i peli dell'animale nel punto dove dev'essere ferito, e si lava anche la pelle colla soluzione di sublimato 1 $^0/_{00}$ e con acqua. In ogni caso si lascia sfuggire il primo getto di sangue, che trascina seco le impurità più grossolane della pelle e si raccoglie il resto, badando di lasciare in quiete sul posto i recipienti ripieni per 20-30 minuti, prima di trasportarli in una ghiacciaia, o in un luogo fresco: quivi devono lasciarsi per 24-48 ore, finchè il coagulo sanguigno abbia spremuto fuori il siero limpido citrino, che si raccoglie nella parte superiore del vaso. Spesso restano commisti al siero corpuscoli rossi, i quali gli impartiscono un colore rossastro, più o meno intenso; questo però, finchè non toglie al siero la sua trasparenza, non nuoce gran che, giacchè durante la sterilizzazione il siero si fa più chiaro, precipitando i globuli rossi al fondo dei tubi, nei quali viene distribuito.

Una piccola avvertenza da avere si è di interporre fra il coperchio e le pareti del recipiente un pezzo di carta bibula, per far sì che il coperchio non resti, per opera del sangue che va sempre ad imbrattare i margini del vaso, aderente a questo tenacemente; se ciò avviene, allorquando si deve togliere il coperchio per raccogliere il siero, è difficile evitare che il liquido si agiti e che il siero si intorbidi. Un'altra avvertenza utile, per ottenere che si separi una quantità maggiore di siero, è quella di distaccare con una bacchetta di vetro sterilizzata il coagulo sanguigno dalle pareti del vaso, tutto attorno, dall'alto al basso, non appena la coagulazione del sangue si è fatta completa.

Si prende generalmente il sangue di bue, di vitello, di cavallo, o di agnello; quello di montone è poco adatto. Non si può precisare con esattezza il tempo necessario alla separazione del siero, giacchè esso è diverso nei singoli casi; ma in generale dopo 24 o 48 ore il siero si può già raccogliere con grosse pipette sterilizzate, per distribuirlo nei tubi da saggio, o nelle boccette d'Erlenmeyer, secondo si vuole.

Il sangue dei bovini coagula lentamente e dà poco siero, quello di cavallo invece fornisce grandi quantità di siero limpido, il quale è anche specialmente adatto per la cultura dei bacilli tubercolari..

Il siero raccolto si sottopone alla sterilizzazione discontinua a 58° C. per 6-8 giorni consecutivi, giusta la norme già esposte

L'altra maniera di raccogliere il sangue è quella di prenderlo sterile dai vasi sanguigni dell'animale (o dell'uomo), e di conservarlo tale fino alla separazione del siero.

Fra i varî metodi per ciò proposti esponiamo quello d Nocard e Roux (1), il quale per l'uso comune è il più pratico e il meno complicato di tutti. Il recipiente per raccogliere il sangue è un vaso cilindrico di vetro, chiuso da un tappo d'ovatta attraversato da un tubo di vetro ricurvo, la cui parte libera è affilata, in modo da potersi adattare esattamente alla cannula del trequarti, col quale si punge la vena. Il recipiente viene sterilizzato come al solito. Il sangue si prende dalla giugulare di un grosso animale (vitello, o cavallo), la quale si mette facilmente in evidenza, comprimendola dall'esterno alla base del collo. Si radono i peli e si brucia la pelle con un ferro rovente nel punto dove si vuole fare la puntura, si immerge il trequarti sterilizzato nella vena, e vi si adatta il tubo di vetro del recipiente, dopo averne rotta la estremità e fattala passare sulla fiamma. Il sangue si raccoglie nel recipiente, e avendo

(1) Annales de l'Institut Pasteur, Vol I 1887, pag. 20.

cura di chiudere poscia con una fiamma l'estremità del tubo di vetro, vi si conserva perfettamente sterile; separatosi il siero, lo si raccoglie colla pipetta e si distribuisce come d'ordinario.

Questo metodo, oltrechè essere semplice, ha pure il vantaggio che uno stesso animale può servire un gran numero di volte per accogliere il siero.

Si può anche introdurre in una vena o in un'arteria di un animale, messa a nudo, la punta del tubo di vetro capillare di una pipetta Chamberland (fig. 26) sterilizzata, ed aspirare il sangue entro la pipetta, chiudendo poscia colla fiamma l'estremità del tubo di vetro; quando si è separato il siero, lo si versa nei tubi da saggio.

Questo metodo in pratica non corrisponde molto bene, perchè nell'atto di versare il siero nei tubi, succede facilmente che si mescolano ad esso globuli rossi che lo intorbidano.

Per avere il siero di sangue umano, si usa il salasso, oppure si estrae il sangue colla siringa Tursini, come si è detto (pag. 176), o finalmente si raccoglie il sangue dalla placenta, introducendo, come consiglia Bumm, l'estremità placentare del cordone ombellicale reciso entro un recipiente sterilizzato, per quivi raccogliere il sangue che si spreme fuori dalla placenta, mediante la compressione esterna esercitata sull'utero.

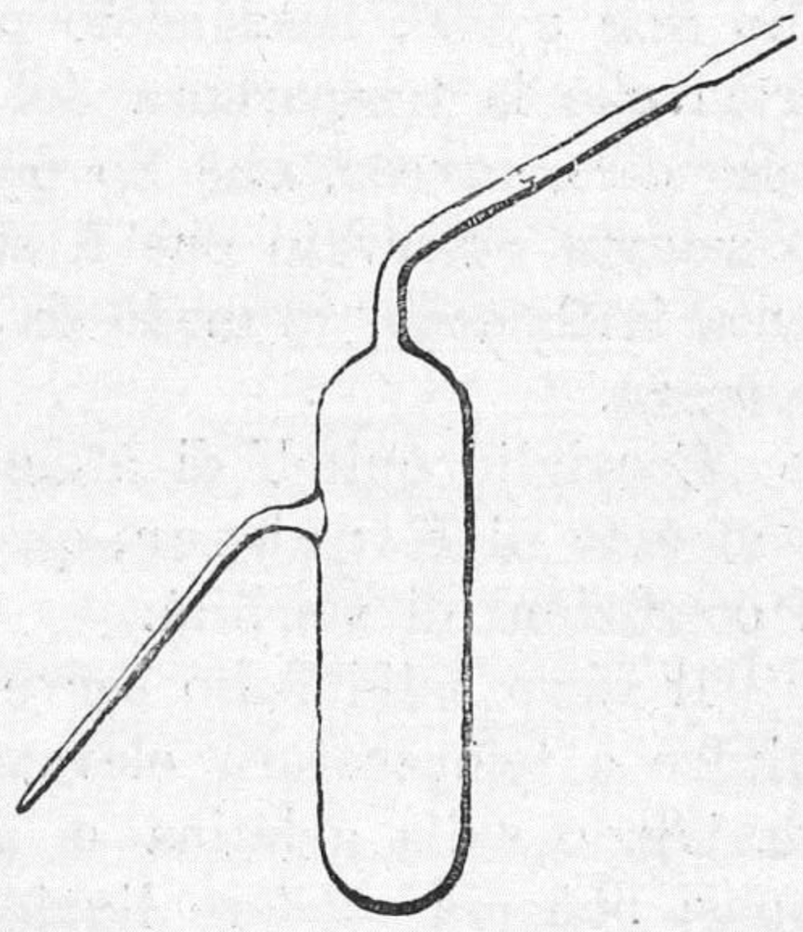


Fig. 26. — Pipetta Chamberland.

Tutte le volte che si può, è sempre meglio raccogliere il siero sterile, che sterilizzarlo in seguito, sia pel tempo che si risparmia, e sia anche perchè, come già si disse a proposito del metodo di sterilizzazione di Tyndall, in certi casi non si riesce a sterilizzarlo.

Comunque sia il siero, sterile o sterilizzato, si fa solidificare nell'apparecchio e nel modo già descritto, per averlo solido e trasparente. Sulla superficie del siero liquido si forma spesso una pellicola biancastra di colesterina, che non deve essere scambiata collo sviluppo di microrganismi.

Dopo avere solidificato il siero, non conviene adoperarlo subito per le culture; è buon precetto invece lasciarlo per tre giorni nel termostato a 37° C., oppure per 5 o 6 giorni alla temperatura dell'ambiente, ed utilizzare quei tubi nei quali, dopo questo tempo, non si è verificato sviluppo alcuno di microrganismi.

Le difficoltà già esposte, che si incontrano nella sterilizzazione del siero col metodo di Koch-Tyndall, hanno spinto altri a cercare di ottenere lo stesso scopo per altra via.

Alcuni hanno proposto la filtrazione del siero, ed altri l'aggiunta di sostanze chimiche capaci di distruggere i batterî senza alterare le proprietà fisiche e chimiche del siero. Un buon mezzo è quello proposto da Kirchner (1), basato sull'osservazione, che aggiungendo 1-2 % di cloroformio al siero di sangue, raccolto senza le dovute cautele antisettiche, e lasciandolo per due mesi alla temperatura dell'ambiente, il siero dopo questo tempo si trova sterile, inalterato, capace di solidificarsi e adatto per lo sviluppo dei batterî, come il siero normale. Si è proposto per ciò di usare questo mezzo, a preferenza del calore, per la sterilizzazione del siero, essendo di riuscita più certa, per quanto esiga un tempo molto lungo.

Hueppe (2), per evitare la sterilizzazione discontinua, propone di solidificare il siero, appena distribuito, alla temperatura di 68°-70° il siero semplice, e di 75° quello glicerinato, e poscia, una volta compiuta la solidificazione, di elevare la temperatura dell'apparecchio fino a 90°, lasciandolo per mezz'ora a questo grado. Egli afferma che la trasparenza del siero non ne soffre. Per mio conto posso dire, invece, che ho più volte sperimentato un tal mezzo, ma ho sempre osservato che il siero solidificato, tenuto a 90° C., diventa lattiginoso, in modo da perdere molto della sua primitiva trasparenza.

Consiglio quindi di attenersi alla sterilizzazione discontinua, o al metodo di Kirchner, quando non si possa raccogliere il siero in condizioni di sterilità.

Il siero solidificato serve assai bene, come si è detto, per le culture a temperatura elevata dei batterî parassitarî; ha però lo svantaggio sulla gelatina e sull'agar che, una volta fatto solido, non si può più rendere liquido a volontà, come quei mezzi, e non può quindi servir bene, come quelli, per lo isolamento dei germi che si vogliono coltivare col metodo delle culture piane.

Già Koch aveva cercato di rimediare a tali inconvenienti, preparando una miscela di siero di sangue e di gelatina; ma questa miscela non offre molti vantaggi sulla gelatina semplice, giacchè non può essere adoperata alla temperatura di 37°. Servirebbe bene invece la mescolanza di siero e di agar; ma se la si prepara, come

(1) Kirchner, *Untersuchungen über die Einwirkung des Chloroforms auf di Bacterien*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 8.°, 1890, pag. 465.

(2) Opera citata pag. 265.

alcuni hanno proposto, mescolando in parti eguali il siero e l'agar nutritiva, preparata con un quantitativo di agar doppio dell'ordinario, e sterilizzando a 58° col metodo Tyndall, si ha poi l'inconveniente che la fusione della miscela, ad una temperatura inferiore a quella in cui il siero si fa solido, riesce difficilmente. Per ovviare a questa difficoltà, Hueppe (1) ha invece proposto di preparare a parte il siero sterilizzato e l'agar nutritiva al 2 %, con aggiunta di zucchero d'uva, di fondere l'agar lasciandola raffreddare fino a 42° C., di fare la diluzione del materiale di cultura nel siero liquido, riscaldato a 37°, e di mescolare infine coll'agar fusa, entro le scatole di Petri, o in altri recipienti consimili, un egual volume di siero contenente i germi da coltivare.

Al siero sanguigno si possono anche aggiungere altre sostanze per aumentarne la facoltà nutritiva.

Si è già parlato a proposito dell'agar dell'aggiunta di glicerina, in proporzione del 5-6 %, proposta da Roux e Nocard per rendere il siero più adatto allo sviluppo dei bacilli tubercolari, che serve anche a mantenere più umida la superficie del siero. — Löffler ha proposto di mescolare col siero il brodo di carne, neutro e filtrato, contenente 1 % di peptone, 1 % di glucosio e ½ % di sal di cucina, nelle proporzioni di 3 parti di siero e di 1 di brodo. Questa miscela si solidifica bene, come il siero ordinario, ed è specialmente adatta per lo sviluppo del bacillo della difterite.

Per potere osservare col microscopio, a debole ingrandimento, le culture sviluppate sul siero di sangue, Koch ha proposto di farlo solidificare entro piccole scatole di vetro munite di coperchio (*Dosen*), le quali si dispongono, come le culture sui portoggetti, nelle campane doppie di vetro e si tengono nel termostato.

Per gli innesti nel siero non si può adoperare che un materiale puro, o che contenga soltanto un piccolo numero di germi, altrimenti lo isolamento di questi non si ottiene. Di fronte però a questo svantaggio, che ha il siero sulla gelatina e sull'agar, e di fronte alle difficoltà tecniche della sua preparazione, sta il fatto che il siero è il substrato più adatto per lo sviluppo dei microparassiti; e ciò, sia per la sua composizione, e sia perchè si può mantenere alla temperatura del corpo. Non dimentichiamo infatti che Koch è riuscito a coltivare i bacilli tubercolari soltanto coll'uso di questo mezzo di nutrizione.

Come il siero del sangue, può benissimo usarsi per le culture anche il *siero dei trasudati* dell'uomo (trasudato della pleura e della vaginale del testicolo, liquido ascitico, ecc.), il quale si fa sterilizzare e solidificare, colle stesse norme già esposte.

Tralasciamo di parlare dell'albumina delle uova di certi uccelli (Schenk (2) e dal Pozzo), che ha la proprietà di solidificare a

(1) Hueppe, *Ueber Blutserum-Culturen*, Centralbl. f. Bacter, Vol. 1.°, 1887, pag. 607.
(2) Baumgarten's Jahresbericht, 1887, pag. 47

70° C. conservandosi trasparente, come pure dell'albumina d'uovo di pollo alcalinizzata e resa trasparente, proposta da Tarchanoff e Kolessnikoff (1), giacchè tali mezzi di nutrizione sono costosi e di lunga preparazione, senza avere alcun vantaggio sul siero del sangue.

3. Metodi di cultura.

Vediamo ora in quante e quali maniere si adoperano le sostanze nutritive, di cui si è finora parlato, per coltivare in esse artificialmente i microrganismi.

Il punto principale, il nodo della questione di qualsiasi studio batteriologico, si è di ottenere allo stato di purezza la specie batterica che si deve studiare, il che è quanto dire ottenerla isolata dagli altri microrganismi, coi quali in generale si trova commista. Il materiale di studio infatti, di qualunque provenienza esso sia, nella grandissima maggioranza dei casi contiene una miscela di varî batterî, e quand'anche in casi eccezionali ne contenga uno soltanto, deve sempre chi studia accertarsi, anzitutto, dello stato reale di purezza della specie batterica che dee formare oggetto delle sue ricerche.

a) Culture isolanti.

È per ciò che il problema delle culture isolanti ha affaticato sempre la mente dei batteriologi, i quali si sono sforzati di risolverlo in diverse maniere. Il più fortunato di tutti però è stato Koch, giacchè il suo metodo supera di gran lunga per semplicità ed esattezza gli altri prima proposti, riunendo in sè tutti i vantaggi che ciascuno di quelli offriva singolarmente.

Per quanto i metodi precedenti a quello di Koch abbiano non solo un valore storico, ma un valore reale, almeno alcuni, anche oggigiorno, tuttavia per l'indole del libro, che dev'essere essenzialmente pratico, esponiamo in esteso soltanto quest'ultimo; giacchè degli altri quelli che sono buoni, sono anche così complicati, che non possono in pratica venire applicati abitualmente per le ricerche comuni.

Il principio fondamentale del metodo di Koch sta nell'uso dei mezzi di cultura solidi, nei quali i germi che vi si depositano, restando fissi sul luogo e moltiplicandovisi, dànno origine ad un ag-

(1) Baumgarten 's Jahresbericht, pag. 479.

gregato di microrganismi, tutti simili al germe primitivo, che ha nome di *colonia*, e che resta separato, costituendo così una *cultura pura*, finchè almeno non si è esteso talmente, da giungere a contatto delle colonie vicine.

Questo fatto si può verificare con un'esperienza semplicissima, che quì riferiamo perchè è stata precisamente il punto di partenza del metodo di Koch. Se le due metà di una patata, cotta e dimezzata, si lasciano colle superfici di taglio esposte all'aria per qualche minuto, e si ripongono poscia entro una campana doppia di vetro, dopo 2-3 giorni vi si vedono apparire piccole macchie puntiformi, di vario aspetto, spesso anche di diverso colore, isolate le une dalle altre, finchè sono piccole, le quali costituiscono altrettante *colonie*, o *culture pure* dei germi caduti dall'aria sulla superficie delle patate. Basta infatti fare di ciascuna di esse un preparato microscopico, per acquistare la certezza che sono, per la massima parte almeno, composte ciascuna da una sola forma di microrganismi.

Se al fatto della solidità aggiungiamo l'altro della *trasparenza*, che hanno appunto i mezzi nutritivi proposti da Koch, ne risulta tosto per le culture isolanti un altro vantaggio grandissimo, che è quello di potere, con ingrandimenti non molto forti, osservare direttamente al microscopio le particolarità di struttura delle piccole colonie. In tal modo infatti riesce possibile controllare, anche meglio che colla semplice visione oculare, la purezza della cultura e distinguere in pari tempo le diverse specie batteriche le une dalle altre, giovandosi del loro diverso modo di raggrupparsi nelle colonie.

L'uso adunque di mezzi *solidi* e *trasparenti* è quello che contradistingue da tutti gli altri il metodo di Koch, rendendolo in pari tempo superiore a tutti per esattezza, come per semplicità e per comodità di applicazione.

Detto ciò, resta inutile spendere parole ulteriormente per dimostrare la superiorità delle sostanze nutritive di Koch sui liquidi, prima usati, sui quali le prime hanno anche il vantaggio di rendere superflua l'applicazione di quelle cautele grandissime, che eran prima necessarie per proteggere le culture dall'inquinamento coi germi dell'aria. Se questi, infatti, cadono direttamente sulle colonie, è facile costatarne la presenza coll'osservazione semplice oculare, o con quella microscopica a debole ingrandimento; e se poi cadono in un punto vicino, restano fissi sul posto e quivi si sviluppano, senza inquinare, almeno finchè le colonie sono piccole, la cultura dei batterî che si devono studiare.

La gelatina nutritiva venne in principio usata da Koch per ottenere lo isolamento delle miscele batteriche, sotto forma di *culture sui portoggetti*. I comuni vetrini portoggetti, sterilizzati, vengono anzitutto disposti, coperti di una campana di vetro, su di un

piano orizzontale, o meglio sull'*apparecchio livellatore* e *refrigerante*, qui disegnato (fig. 27).

Quest'apparecchio consta essenzialmente di un sostegno triangolare, poggiato su tre viti, per mezzo delle quali si può ad esso dare una posizione esattamente orizzontale, servendosi di una livelletta a bolla d'aria, posta sulla lastra di vetro superiore. Sul treppiedi poggia una vaschetta, entro la quale se ne contiene un'altra più piccola, ricoperta da una lastra di vetro quadrangolare.

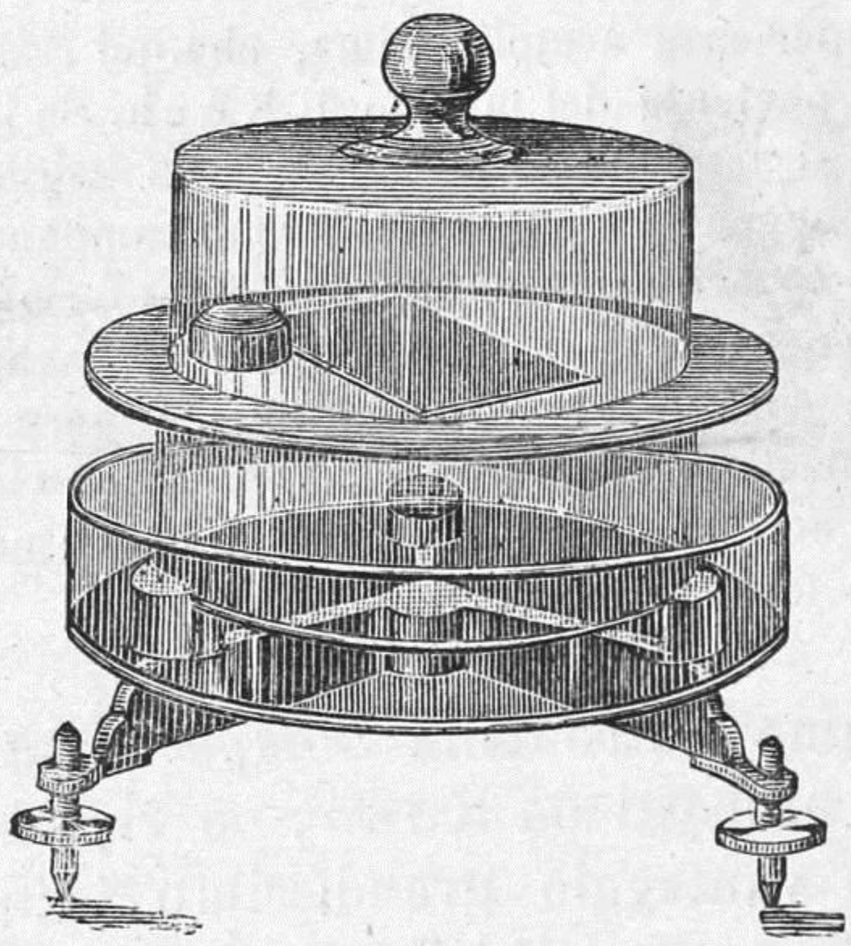


Fig. 27 — Apparecchio livellatore e refrigerante.

La vaschetta piccola è destinata a contenere l'acqua fredda, mescolata con ghiaccio, per raffreddare rapidamente la gelatina che si versa sulle lastre di vetro o sui portoggetti, posti sulla lastra di vetro quadrangolare; la vaschetta grande serve a raccogliere l'eccesso di acqua che fuoriesce da quella piccola, allorquando la si ricopre colla lastra anzidetta.

Anche di tali apparecchi livellatori vi sono parecchi modelli: quello ora descritto è però il più comunemente usato.

Messi i portoggetti in posizione orizzontale, si aspira entro una pipetta sterilizzata la gelatina fluidificata a 30° C. nei tubi da saggio, e raffreddata poscia sotto un getto d'acqua fino al punto da avere una consistenza sciropposa, e la si versa sui portoggetti, in modo che formi su questi uno strato di qualche millimetro di spessore che non arrivi ai margini del vetrino. Si bagna la punta di un ago di platino diritto, sterilizzato, nel materiale di cultura e con essa si disegnano rapidamente sulla gelatina, non ancora completamente solidificata, 3-4 strie parallele, separate da un intervallo di circa 2 cm., senza che l'ago arrivi a toccare la superficie del vetro.

Praticati gli innesti e solidificata completamente la gelatina, i portoggetti si dispongono in serie di 3-4 sulle banchette di vetro, coperte di carta bibula e sovrapposte l'una all'altra entro campane doppie di vetro, preparate come fu detto.

Questi « innesti lineari » hanno per oggetto la distribuzione dei germi che sono aderenti all'ago di platino, separati l'uno dall'altro nella gelatina, in modo che, restando poscia fissati ognuno al suo posto, si sviluppino da essi altrettante colonie isolate, la cui purezza si controlla poscia coll'osservazione microscopica, e colla successiva ripetizione su altri portoggetti degli stessi innesti, fatti col materiale di tutte le colonie, le quali presentano un aspetto diverso.

È facile comprendere come con tal metodo si riesca nello scopo di isolare i diversi microrganismi mescolati fra di loro, soltanto allorchè essi nel materiale primitivo sono in picciol numero. Questo metodo infatti si usa oggidì raramente, giacchè molto maggiori vantaggi offre l'altro proposto più tardi dallo stesso Koch, per lo stesso scopo, che è quello delle *culture sulle lastre di vetro*, che oggi può meglio chiamarsi metodo delle *culture piane* (*Plattenverfahren* dei tedeschi), giacchè per esso si adoperano ora non solo le lastre di vetro, ma anche recipienti di forma diversa, nell'intento comune di « distendere la gelatina fluida su larga superficie, in modo che » i germi che si trovano in essa distribuiti, nell'atto della sua so- » lidificazione restino fissati distanti l'uno dall'altro, cosicchè da » ciascuno di essi abbia origine una *cultura netta* dei singoli mi- » crorganismi ».

Questo è il principio fondamentale del metodo di Koch, pel quale appunto la gelatina serve mirabilmente, giacchè in essa, resa fluida a 30° C., si può ottenere la distribuzione dei germi, come nei liquidi, mentre raffreddata poscia al disotto di 25° C. acquista la proprietà ed i vantaggi di un mezzo solido e trasparente.

Il metodo consta adunque di diversi momenti. Il primo di questi è la distribuzione nella gelatina fluida del materiale contenente i microrganismi, che dev'essere fatta in modo che ogni germe nell'atto della solidificazione resti separato e ad una certa distanza dagli altri, per potere poscia fare l'osservazione e la « pesca » di ciascuna colonia isolata. A tale scopo si prepara anzitutto la gelatina fusa, mettendo i tubi da saggio, nei quali si trova distribuita, in un bagno maria a 30-35° C., e si tengono pronte le lastre di vetro sterilizzate entro la scatola di lamiera di ferro.

Le lastre di vetro hanno lo spessore dei comuni portoggetti, e possono essere di grandezza variabile: quanto a ciò è bene regolarsi in modo, che le lastre, pure avendo una superficie sufficiente perchè vi si possano distendere i 10 cc. di gelatina contenuti in ogni tubo, senza toccarne i margini, possano in pari tempo venire osservate col microscopio in tutta la loro estensione. Si consigliano perciò generalmente lastre di vetro rettangolari, o meglio smussate agli angoli, di 12 × 10 cm. oppure di altra grandezza corrispondente alla larghezza del tavolino del microscopio che si possiede.

Si estrae una lastra di vetro dalla scatola, afferrandone i margini fra due dita, senza toccarne le superficie, e si depone sull'apparecchio livellatore, preparato nella maniera già esposta, ricoprendola subito con una campana per proteggerla dai germi dell'aria.

Si prende allora un tubo con gelatina fusa, si smuove in giro il tappo di cotone, per assicurarsi che non è aderente e che lo si

può estrarre facilmente, se ne brucia sulla fiamma l'estremità, per uccidere i germi che si possono trovare sull'ovatta o sul margine del tubo, e si afferra questo fra il pollice e l'indice della mano sinistra, tenendone l'orificio alquanto inclinato in basso, senza però che la gelatina arrivi a toccare il tappo.

Coll'ago di platino ripiegato ad ansa e sterilizzato, tenuto colla destra a mo' di penna da scrivere, si prende una piccola quantità del materiale contenente i germi da isolare, e dopo avere estratto dal tubo il piumacciolo di cotone, si immerge l'ago nella gelatina, agitandolo in essa e sfregandolo contro le pareti del tubo, perchè il materiale che vi è aderente si distacchi e si distribuisca nella gelatina; si richiude tosto il tubo e si completa la distribuzione uniforme dei germi nella gelatina, piegando il tubo alternativamente in basso ed in alto, ed agitandolo con precauzione, senza che vi si formino bolle d'aria. Nel far ciò bisogna sempre badare di non toccare colle mani il margine libero del tubo da saggio. Si versa finalmente la gelatina nel mezzo della lastra di vetro, e si distribuisce su di essa strisciandovi sopra il margine del tubo, in modo che la gelatina non arrivi a toccare i margini della lastra. Appena è solidificata, si prende la lastra fra due dita e si depone su di una banchetta di vetro, entro una campana preparata con carta bibula bagnata.

Questa è la maniera più semplice di applicare il metodo delle culture piane. Una tale procedura però, quale è stata ora descritta per indicare nel modo più spiccio i particolari del metodo, si usa in pratica assai raramente, perchè è raro il caso che in quella quantità di materiale che si raccoglie coll' ansa di platino esista un numero di germi così piccolo, da permettere la loro distribuzione e il loro fissamento nella gelatina, ad una distanza sufficiente l'uno dall'altro. Invece è necessaria quasi sempre una diluzione maggiore dei germi, la quale si opera in maniera diversa, a seconda dei casi. Si può, cioè, fare anche la diluzione nella gelatina, oppure stemperare prima il materiale in un certo volume di acqua sterilizzata, e prendere di questa una data quantità coll' ansa di platino, da distribuirsi nella gelatina, come è stato ora descritto.

La prima maniera si adopera specialmente allorquando si ha interesse soltanto di isolare una o più specie batteriche, senza curarsi del numero di esse contenute nel materiale di ricerca, ed è stata applicata da Koch per isolare il bacillo colerigeno dalle feci diarroiche degli infermi. Si prendono 3 tubi di gelatina fusa e si scrive su ciascuno di essi con un lapis adatto per scrivere sul vetro, oppure servendosi delle comuni etichette, i numeri 1, 2 e 3;

si comincia dallo « infettare » come è sopra descritto, il tubo 1, e dopo aver praticata in esso la distribuzione dei germi, lo si afferra fra il pollice e l'indice della mano sinistra, tenendo in pari tempo colla stessa mano fra l'indice e il medio il tubo 2, colla palma della mano diretta all'insù e coll'estremità libera dei tubi verso l'operatore. Si prepara l'ago di platino sterilizzato, si tolgono i turaccioli di cotone dai due tubi, mettendone uno fra il 3.° ed il 4.° dito e l'altro fra il 4.° ed il 5.° dito della mano sinistra, e si prende coll'ansa di platino una goccia di gelatina dal tubo 1, portandola rapidamente nel tubo 2, dove si distribuisce, avendo l'avvertenza di strisciare l'ansa di platino, prima di estrarla, sulle pareti del tubo, perchè vi resti aderente meno gelatina che si può; si ripete la stessa operazione senza sterilizzare l'ansa, da 3 a 5 volte, secondo la ricchezza di germi del materiale primitivo, trasportando così e mescolando nella gelatina del secondo tubo 3 o 5 piccole goccie della prima diluzione.

Si ripongono i turaccioli, ciascuno al suo posto, si depone il tubo 1 in un bicchiere, si rimescola e si agita il tubo 2, e si ripetono le stesse operazioni fra il tubo 2 e il tubo 3. Si versa finalmente il contenuto dei tubi su altrettante lastre di vetro, le quali, compiuta la solidificazione, si mettono entro una campana doppia di vetro su altrettante banchette, una sopra l'altra, segnando sulla carta bibula che le copre le indicazioni relative al numero delle diluzioni (1, 2 e 3), alla data e al materiale adoperato.

Quanto si è ora descritto non vale naturalmente, in tutti i suoi particolari, per tutti i casi. Così, ad es., a seconda del materiale che si adopera e della sua richezza in germi, si trasporta da un tubo all'altro una sola o più goccie di gelatina coll'ansa di platino, oppure si adopera per ciò una bacchetta di vetro sterilizzata, oppure anche una pipetta.

La seconda maniera di operare la diluzione del materiale, nell'acqua sterilizzata dapprima e poscia nella gelatina, serve specialmente nel caso in cui si vuol conoscere, oltre la qualità, anche il numero dei germi capaci di sviluppo, che si contengono nel materiale di studio, ma si adopera anche allorquando si tratta soltanto di separare le diverse specie batteriche, specialmente se il materiale ne è molto ricco. Si ritiene anzi da alcuno (Miquel) che la separazione dei germi avvenga nella gelatina in maniera incompleta, e che nell'acqua invece sia più perfetta; per cui il metodo « misto » della diluzione nell'acqua e delle culture in gelatina sarebbe preferibile in ogni caso a quello semplice di Koch.

Usando un tal metodo, se si vuole semplicemente isolare i

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

batteri diversi, si diluisce il materiale nell'acqua distillata e sterilizzata, in proporzione sufficiente perchè i germi contenuti in una piccola quantità della diluzione, raccolta coll'ansa di platino e distribuita in un tubo di gelatina fusa, restino in questa, allorquando si solidifica in ampia superficie, ad una conveniente distanza l'uno dall'altro; se si tratta invece di conoscere anche il numero dei germi (analisi dell'aria, delle acque molto immonde, ecc.), bisogna prendere una determinata quantità di materiale, diluirlo in una data misura di acqua sterilizzata, e di questa prendere con una pipetta, graduata a frazione di centimetro cubico e sterilizzata, una certa quantità da mescolarsi colla gelatina, *more solito*.

In qualunque modo siasi praticata la diluzione del materiale, dopo aver riposto le lastre, su cui si è distesa la gelatina, entro le campane doppie di vetro, bisogna attendere che si sviluppino le colonie ad una temperatura inferiore ai 25° C., il che accade dopo un tempo variabile, secondo la temperatura e secondo le diverse specie batteriche. Tenendo le culture nell'ambiente, come generalmente si usa per quelle in gelatina, le colonie appaiono visibili ad occhio nudo dopo 2, o 4, o più giorni, a seconda dei casi.

Come si dirà meglio a proposito dell'analisi dell'acqua, havvi una differenza talvolta molto notevole fra la rapidità di sviluppo dai diversi microrganismi nella gelatina; ve ne ha pure di quelli che in questo mezzo non si sviluppano affatto: per cui non si può, dal numero delle colonie sviluppate nella gelatina, giudicare con esattezza del numero di batterî viventi contenuti nel materiale di ricerca.

L'esame ad occhio nudo, e quello microscopico fatto con un obbiettivo debole (N. 3 Reichert o Koristka, A. A. Zeiss) e con diaframma stretto, permettono di riconoscere una serie di particolarità interessanti, che servono a distinguere una specie dall'altra, e delle quali alcune si vedono ad occhio nudo, ed altre invece col microscopio Tali proprietà si riferiscono specialmente al *colorito* (rosso, giallo, violetto, ecc., o nessun colore), alla *struttura* delle colonie (granulose, a strati concentrici, ecc.) e all'essere queste *fondenti* o non *fondenti*, il che è in relazione colla produzione, o meno, di un fermento peptonizzante per opera dei batterî.

Nell'osservazione microscopica delle colonie a debole ingrandimento conviene ricordare, per non cadere in errore, che le colonie che si sviluppano nello spessore della gelatina possono avere un aspetto diverso da quelle che sono superficiali, anche se appartenenti ad una stessa specie batterica; e ciò in dipendenza delle diverse condizioni fisiche in cui si trovano i microrganismi, che si moltiplicano nell'interno o sulla superficie della gelatina. È perciò che, per giudicare con sicurezza che colonie di aspetto diverso sono pure composte da diversi microrganismi, bisogna fare anche l'esame microscopico con ingrandimenti forti. Questo si può fare, o mediante preparati colorati sui coproggetti coi metodi ordinarî, oppure deponendo un vetrino sulla colonia, schiacciando alquanto la gelatina ed osservando coll'immersione omogenea. In tal caso si può non soltanto imparare meglio a conoscere la struttura della colonia, ma si può anche, osservandone i margini, vedere la forma dei batterî di cui è composta. Si può anche, se si vuole, fissare sul vetrino e colorare la colonia intiera nella maniera già esposta.

Dopo avere esaminato le diverse colonie ad occhio nudo ed al microscopio con debole e forte ingrandimento, si fa il trapianto di ciascuna di esse in altrettanti tubi di gelatina (o di agar, o di siero), e si ha così di ciascuna una cultura isolata. Si designa col nome di « pesca » delle colonie l'atto di raccogliere coll'ago di platino una piccola parte di esse, per trapiantarle in un nuovo mezzo di nutrizione contenuto nei tubi da saggio. Questo si può fare colla guida dell'occhio nudo, ma è sempre meglio, specialmente se si tratta di piccole colonie, farlo coll'occhio armato di lente al microscopio. A tal'uopo si dispone la colonia che si vuol « pescare » nel mezzo del campo microscopico, adoperando un obbiettivo debole e un oculare forte, si caccia la punta dell'ago di platino sterilizzato, che può essere anche ripiegata per un breve tratto a martello, fra l'obbiettivo e la cultura, e la si immerge, seguendola coll'osservazione microscopica, nel centro della colonia, rialzandola subito e infiggendola poscia nella gelatina contenuta nel tubo, colle norme descritte in appresso.

L'uso della gelatina per le culture isolanti ha un certo limite, imposto dal duplice fatto dell'essere essa liquida alla temperatura di 37° C., e di venire fluidificata per opera dei batterî produttori di fermento peptonizzante; per cui la gelatina non può adoperarsi per lo isolamento dei microrganismi che si sviluppano soltanto a temperature elevate, e in ogni caso, se nel miscuglio vi sono numerose specie fondenti, queste distruggono rapidamente tutta quanta la gelatina ed impediscono così lo sviluppo isolato delle altre specie.

A tale deficienza si ripara adoperando l'agar, la quale resta solida anche a 37° C. e non viene disciolta dai fermenti. L'uso dell'agar per le culture isolanti col metodo di Koch non è però così comodo e facile, come quello della gelatina: bisogna anzitutto far fondere l'agar, mettendo i tubi nell'acqua bollente, e farla poscia raffreddare in un bagno maria fino a 40° C. circa, per impedire che la temperatura troppo alta offenda i germi che vi si mescolano. La miscela e il versamento delle lastre deve farsi rapidamente, altrimenti l'agar diventa solida di bel nuovo.

Si può ovviare a tale inconveniente, adoperando un apparecchio livellatore metallico ripieno di acqua a 50° C., quale è rappresentato dalla fig. 28, oppure riscaldando leggermente sulla fiamma le lastre di vetro. Di leggieri si comprende che il primo mezzo è assai migliore, non potendo determinarsi esattamente la temperatura della lastra riscaldata sulla fiamma.

L'agar ha pure l'inconveniente di aderire poco al vetro, e di scivolare quindi facilmente giù dalle lastre. Per rimediare a ciò, si suole

deporre sulle lastre, ai quattro angoli, nel limite a cui deve arrivare lo strato d'agar, quattro goccie di ceralacca, che impediscono lo scorrimento di essa. Meglio è però servirsi dell'agar con aggiunta di gomma, oppure del miscuglio di agar e di gelatina. Quest'ultima è specialmente da raccomandarsi per le culture isolanti col metodo di Koch. Se si adoperano invece delle lastre di vetro le scatole di Petri, come fra poco si dirà, allora non v'è d'uopo di nessuna di quelle avvertenze; ed anzi oggidì si adoperano per quest'uso quasi esclusivamente le scatole di Petri.

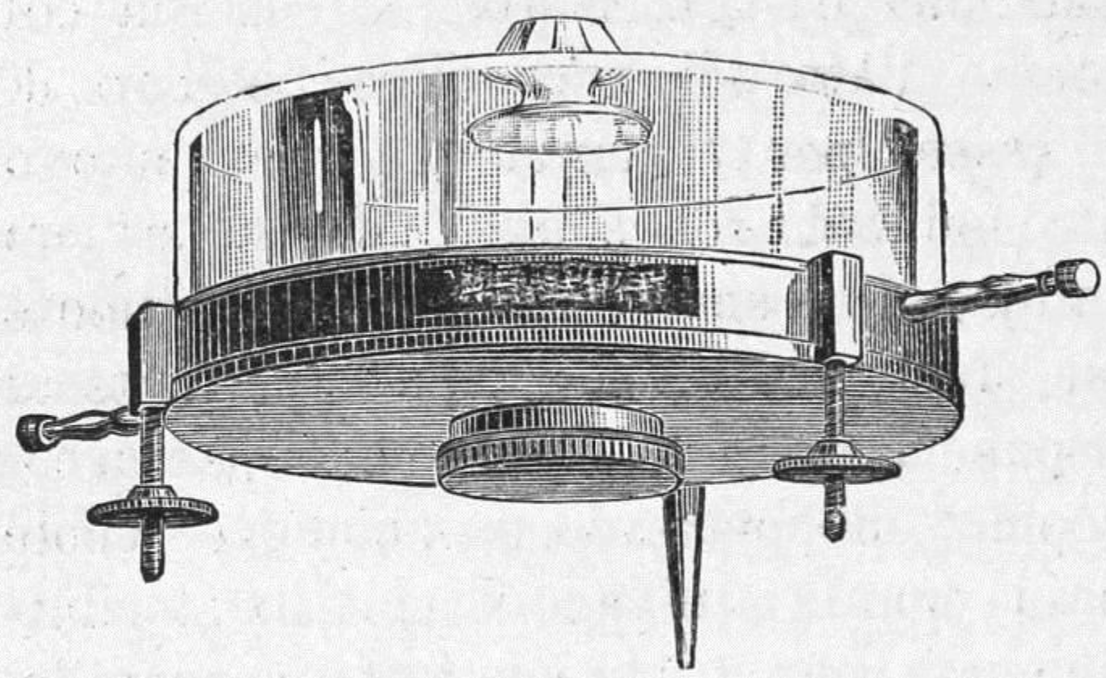


Fig. 28 — Apparecchio livellatore per le culture in agar.

Veniamo ora a parlare delle *modificazioni del metodo di Koch*, limitandoci ad esporre quelle soltanto che realizzano qualche vantaggio positivo sul metodo primitivo, sia per limitare od escludere l'inquinamento coi germi dell'aria, e sia per evitare la perdita di materiale che ha luogo per la gelatina che resta aderente ai tubi, dopo averne vuotato il contenuto; giacchè sono questi i due difetti principali del metodo di Koch.

Una di tali modificazioni, introdotta da Esmarch (1) e nota col nome di *metodo delle culture arrotolate*, consiste nel fare la diluzione nella gelatina liquefatta nei tubi da saggio, nella maniera ordinaria, e nel far solidificare la gelatina in istrato sottile tutto attorno alle pareti del tubo, ricoprendo l'orifizio di questo con una calotta di gomma, ed impartendogli colle dita un movimento di rotazione attorno l'asse maggiore entro l'acqua fredda, fino a che la gelatina si è rappresa.

Per far ciò bisogna avere l'avvertenza di adoperare cotone non idrofilo per chiudere i tubi, altrimenti il tappo si impregna di gelatina. Questo si può impedire egualmente adoperando tubi da saggio speciali, aventi una strozzatura leggera poco distante dall'orificio, come ha proposto Gruber (2). Una tale modificazione riesce utile

(1) Esmarch, *Ueber eine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens zur Isolirung u. zum quantitativen Nachweiss von Mikroorganismen*, Zeitschr. f. Hygiene Vol. 1, 1886 p. 293.

(2) Centralblatt f. Bacteriologie Vol. 1, 1887. Nota in fondo alla pag. 369.

anche per ciò, che restando impedita la formazione di uno strato di gelatina a contatto del turacciolo di cotone, resta pure eliminato uno dei più gravi difetti inerenti al metodo d'Esmarch, che dipende appunto da ciò, che quello strato di gelatina impedisce l'ingresso dell'aria nel tubo, ed ostacola così lo sviluppo dei batterî schiettamente aerobî.

Con qualche esercizio si riesce a distribuire uniformemente la gelatina nell'interno del tubo, senza bisogno di adoperare per ciò un apparecchio speciale, come taluni hanno proposto (1).

Dopo estratti i tubi dall'acqua, si toglie ad essi la calotta di gomma, per lasciare che l'aria vi penetri attraverso il cotone, e quando è avvenuto lo sviluppo delle colonie, l'osservazione microscopica e il conteggio si fanno con un apparecchio speciale, ideato pure da Esmarch, che rinunciamo a descrivere, perchè di uso molto limitato.

Questo metodo ha il vantaggio di essere assai spiccio e di eliminare i difetti, già segnalati nel metodo di Koch, relativi all'ingresso dei germi dell'aria nelle culture, e alla perdita di gelatina che resta nei tubi svuotati. D'altronde però offre altri inconvenienti, molto più gravi, e cioè che la « pesca » delle colonie nell'interno dei tubi è resa assai difficile, e che oltre a ciò, se vi sono batterî fondenti, la gelatina liquefatta inquina rapidamente le colonie vicine, restando così frustrato l'obbiettivo principale di siffatte culture. Non condivido perciò menomamente l'opinione di chi (2) ritiene questa, come la migliore modificazione del metodo delle culture piane.

Il metodo di Esmarch può servire soltanto per ricerche approssimative, oppure per esperienze da farsi lungi dal laboratorio, non richiedendo l'uso di alcun apparecchio speciale.

Molto migliori servigî rende invece un'altra modificazione, la quale consiste nell'adoperare, in luogo delle lastre, la superficie piana di un recipiente di vetro, più o meno completamente protetto dai germi dell'aria. Si sono proposte per questo scopo forme di recipienti assai diverse. Salomonsen ha proposto dapprima le boccette di Erlenmeyer, nelle quali si distribuisce la gelatina, come nei tubi da saggio, ed in questa, resa fluida, si mescola il materiale che contiene i germi da isolare, lasciandola sodificare nel fondo piano della boccetta. In tal modo resta impedita l'entrata ai germi dell'aria, e non v'è più alcuna perdita di gelatina, come col

(1) Herman, *Apparat zum Imprägniren*, ecc., Centralbl. f. Bacteriologie Vol. 7, 1890, p. 57. — Prausnitz, *Kleinere Mittheilungen zum bacteriologischen Technik*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. 9. 1891, p. 130.

(2) Hueppe, Opera citata pag. 350.

metodo di Esmarch. Altri hanno semplicemente modificato la forma delle boccette d'Erlenmeyer, rendendo più estesa la superficie del fondo, ad altri invece hanno proposto l'uso di boccette appiattite, a pareti parallele, con un'apertura laterale chiusa con ovatta.

Tutti questi recipienti hanno in comune l'inconveniente di rendere assai difficile la « pesca » delle colonie isolate, per cui, senza fermarci sulla loro descrizione, diciamo invece che la forma sotto ogni rapporto più conveniente è rappresentata dalle scatole doppie di Petri (1), di cui la metà superiore funge da coperchio, e la inferiore, avente un fondo piano di 10-12 cm. di diametro, è destinata a ricevere la gelatina, o l'agar, liquefatta, contenente i germi da isolare. Queste scatole si sterilizzano nella stufa ad aria calda, involte in carta bianca sottile, per poterle poi conservare e trasportare anche lungi dal laboratorio, senza il pericolo che si inquinino di nuovo coi germi dell'aria.

Quando si debbono adoperare, non si ha che sollevare lateralmente il coperchio, in modo da lasciare aperto da un lato uno spiraglio, per versare nella scatola la gelatina, o l'agar, liquefatta. Rimesso a posto il coperchio, basta imprimere alla scatola un leggero movimento di ondulazione, per far sì che il materiale versatovi vada a ricoprire tutto il fondo, sul quale si solidifica in istrato sottile.

In tal modo non v'è più bisogno di un apparecchio livellatore, nè di campane doppie di vetro, nè di banchette, ed è anche impedito, quasi completamente, l'ingresso dei germi dell'aria. È possibile anche fare l'esame microscopico delle colonie con un ingrandimento debole, rovesciando la scatola ed osservando le colonie attraverso il fondo. Resta soltanto l'inconveniente della piccola quantità di materiale che si perde, aderente al tubo da saggio; ma anche a ciò si rimedia, conservando, ogni volta che si deve fare anche la ricerca quantitativa dei germi, il tubo da saggio vuoto, nuovamente tappato, a lato della relativa scatola di vetro.

Per le culture isolanti nell'agar questa modificazione di Petri deve addirittura avere la preminenza su qualsiasi altra; essa è pure da raccomandarsi per le ricerche che si fanno lungi dal laboratorio (analisi d'acque, ecc.), offrendo vantaggi incontestabili anche sul metodo delle culture arrotolate.

Abbiamo esposto diffusamente e per primo il metodo di Koch, perchè, come fu detto, è di tutti incontestabilmente migliore e di

(1) Petri, *Eine kleine Modification des Koch'schen Plattenverfahrens*, Centrabllatt. f. Bacteriologie Vol. 1, 1887 p. 279.

uso ormai generale; dobbiamo però accennare brevemente anche ad altri metodi, sia per l'interesse storico di alcuni, e sia perchè possono talvolta essere anche adoperati con vantaggio.

Uno dei più antichi è il *metodo dei tubi capillari* di Salomonsen (1876), fondato sull'osservazione dei cambiamenti di colore che si producono nel sangue in putrefazione. Se si aspira il sangue di un animale, integro, o defibrinato, entro tubi capillari, e questi si lasciano alla temperatura dell'ambiente, dopo averne chiuse le estremità con ceralacca, o con altro che tolga il contatto dell'aria, si vedono comparire, dopo un certo tempo, le così dette « macchie di putrefazione », prodotte dalla riduzione dell'ossiemoglobina per opera dello sviluppo dei batterî della putrefazione. Queste macchie, che compaiono ad epoca diversa e sono differenti per forma e per rapidità di sviluppo, finchè sono isolate, rappresentano altrettante colture pure di microrganismi, e si può di ciascuna fare trapianti e culture successive, tagliando il tubo capillare nel punto determinato, e prendendo il materiale dalla macchia coll'ago di platino sterilizzato. Questo metodo può servire per isolare i batterî della putrefazione nel sangue ed anche i batteri patogeni che si trovano nel liquido sanguigno nei processi di setticemia. Secondo i precetti di Salomonsen, i tubi capillari hanno una lunghezza di 50-60 cm. e $^1/_2$-1 mm. di diametro, e si fissano colla ceralacca, che ne chiude le estremità, su liste di cartone bianco, per potere osservare e registrare comodamente lo sviluppo delle « macchie » nel sangue.

Tralasciamo di parlare del metodo delle *culture frazionate* di Klebs, il quale ha un valore affatto secondario, non essendo possibile di isolare con esso una determinata specie di microrganismi, ed esponiamo invece nelle sue linee generali il metodo delle *diluzioni nei liquidi*, il quale, illustrato dapprima da Lister e da Nägeli, è stato ora rimesso in onore specialmente da Miquel, da cui è vantato come il metodo più esatto, per ottenere l'isolamento delle diverse specie batteriche contenute in una miscela.

Questo metodo consiste essenzialmente nel diluire il materiale contenente i batterî nell'acqua distillata e sterilizzata, in modo che una data quantità della diluzione (1 goccia, o 1 cc.) non contenga più che un sol germe, e nel fare con questa la seminagione in recipienti che contengono un liquido nutritivo, nel quale si sviluppa così una coltura netta del microrganismo introdotto. Si fa anzitutto il conteggio dei germi contenuti nel materiale primitivo mediante un apparecchio contaglobuli (di Thoma-Zeiss, di Nachet, ecc.) e poscia, a seconda del numero dei germi contati, si pratica la diluzione necessaria nell'acqua sterilizzata. Un tal metodo è stato specialmente applicato da Miquel (1) per l'esame delle acque, e da lui modificato alquanto, eliminando la parte relativa al conteggio dei germi, e facendo invece, dietro la guida di saggi preliminari, la diluzione nell'acqua in tale proporzione, che distribuita a goccie in una serie di recipienti da coltura (da 12 a 36) *soltanto un quarto di essi* (20 %) *rimanga infetto, e tutti gli altri si mantengano sterili.*

Il saggio preventivo, destinato a indicare la ricchezza approssimativa di batterî nelle acque (o di altro materiale), si pratica introducendo una goccia dell'acqua, tale quale, in 4-5 tubi di brodo, facendo una diluzione ad $^1/_{100}$ (1 cc. in 99 di acqua sterilizzata) ed un'altra a $^1/_{1000}$, od anche più oltre, se si crede necessario, e introducendo di ciascuna una goccia in una serie di 12 tubi di brodo. Questi

(1) Miquel, *Manuel pratique d'analise bacteriologique des eaux*, Paris, 1891.

si tengono nel termostato a 30-35°, e dopo 24 ore, se il brodo seminato colla diluzione $^1/_{1000}$ non si è alterato, oppure se si sono intorbidati 1-2 tubi di brodo soltanto, quest'ultimo sarà il grado di diluzione voluto per l'analisi. In questo frattempo l'acqua da analizzare dev'essere mantenuta a 0°. Prima di fare la diluzione bisogna agitare l'acqua per qualche minuto, e dopo averne aggiunto 1 cc. a 999 di acqua, si agita di nuovo, e poscia con una pipetta di vetro, fatta in modo che lasci cadere 25 goccie per ogni cc., si distribuisce la diluzione in 36 tubi di brodo, in 18 alla dose di 1 goccia, e di 2 goccie negli altri 18. Si fa in pari tempo, per controllo, un' altra prova colla stessa diluzione, oppure coll'acqua diluita del doppio, e i tubi si tengono a 30-35° C. per 15 giorni. Trascorso questo termine, si fa il conteggio dei batterî, contando il numero dei brodi intorbidati, e trascurando le serie di 18 tubi che presentano più del 20 % di alterazione.

Lo stesso Miquel però confessa che resta sempre assai difficile, anche coi saggi preliminari, lo stabilire il grado a cui si deve diluire un'acqua, perchè resti infetto soltanto il 20 % dei tubi d'esperienza, perche, cioè, si abbiano da essa risultati attendibili. Egli è ricorso perciò ad un metodo *misto*, che consiste nel seminare l'acqua diluita, invece che nel brodo, nella gelatina contenuta in una serie di recipienti (12 per ogni esperienza), a fondo piano e largo (fig. 29), in modo che se anche tutti i recipienti seminati restano infetti, e in ciascuno di essi si sviluppano 2 o 3 germi, il conteggio è possibile egualmente senza timore d'andare errati. Oltre questo vantaggio ammesso da Miquel, io ritengo che il metodo misto elimini pure una grave causa d'errore inerente alla cultura nei mezzi liquidi, quale è quella che in essi non è possibile determinare se l'intorbidamento è dovuto allo sviluppo di un solo, oppure di parecchi germi introdotti col liquido d'innesto.

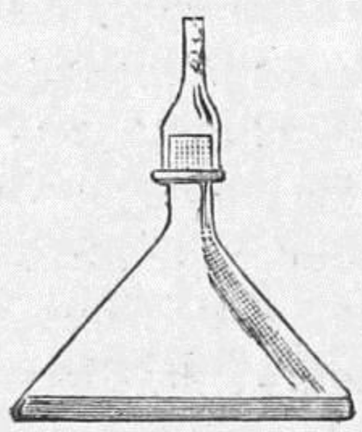


Fig. 29. — Boccetta conica per culture isolanti.

La quantità di germi contenuti nell'acqua, non diluita, si calcola facilmente, mediante una formula generale data dallo stesso Miquel. Se A goccie d'acqua diluita a 1 : $b\ 10^n$ hanno dato origine a un numero C di colonie, supponendo che la pipetta dia 25 goccie per cc., 1 cc. d'acqua naturale ne conterrà

$$\frac{25 \times C \times b \times 10^n}{A}$$

In fondo si vede che anche Miquel, il quale è stato finora un oppositore convinto dell'uso delle sostanze solide di nutrizione secondo il metodo di Koch, si trova costretto a ricorrere a quest'ultimo mezzo, come quello che offre le maggiori garanzie pel risultato delle culture isolanti.

Non v'ha dubbio però che, allorquando si tratta di isolare i germi da un materiale che ne è molto ricco, specialmente se interessa conoscerne il numero, il metodo *misto* della diluzione nell'acqua e delle successive culture in gelatina, dà risultati più attendibili di quello semplice di Koch. Ma in tal guisa il metodo di Miquel non ha più nulla di speciale, all'infuori dei particolari relativi alla maniera di compiere le singole operazioni, i quali hanno bensì un gran peso sul buon esito delle stesse.

Oltre ai mezzi esposti finora di isolamento diretto, ve ne sono altri indiretti, a cui talvolta si può ricorrere con vantaggio per lo stesso scopo, fondati su certe proprietà biologiche dei microrganismi.

Così Pasteur è riuscito ad isolare il bacillo carbonchioso di quello dell'edema maligno, valendosi della proprietà che ha il primo ed essere aerobio, e anaerobio invece il secondo, e facendo le cultura ora in presenza dell'aria ed ora invece in un'atmosfera di CO^2.

Si può egualmente talvolta separare una specie patogena dalle altre che non lo sono, e colle quali si trova commista, mediante l'*innesto negli animali*, nei quali si moltiplica soltanto la specie che è patogena. Questo mezzo, col quale Koch ha per primo isolato il « bacillo della setticemia dei topi », si usa anche ora con vantaggio per ottenere allo stato di purezza il bacillo del carbonchio dal sangue degli animali infetti, e serve pure d'aiuto per ottenere la cultura netta del bacillo della tubercolosi.

Accenniamo inoltre ad un altro mezzo, del quale anche possiamo valerci per ottenere isolati certi microrganismi: e questo è il *riscaldamento*, che trae partito della facoltà che hanno le diverse specie batteriche di resistere a un grado diverso di temperatura.

Questo metodo non può naturalmente avere un'applicazione generale, come taluno ha proposto (Gunning), sia perchè vi sono molte specie che hanno su per giù lo stesso grado di resistenza al calore, e sia perchè una tale resistenza può anche variare nella stessa specie, a seconda delle condizioni esterne di vita e di sviluppo. Il riscaldamento adunque può servire, tutt'al più, ad isolare le forme sporigene dalle altre che non lo sono, ed anche per isolare i bacilli le cui spore sono molto resistenti, allorquando però con esse non se ne trovino commiste altre che hanno una resistenza eguale, o maggiore. È infatti per mezzo del riscaldamento che Kitasato è riuscito ad ottenere la cultura netta del bacillo del tetano.

Finalmente un mezzo, il quale non è sufficiente da solo, ma può in certi casi servire d'aiuto per lo isolamento dei batterì, come ha provato per primo Ali-Cohen (1), è la *chimiotassi*, a cui si è già accennato, parlando della fagocitosi come teoria di spiegazione dell'immunità.

La parola *chimiotassi*, è stata applicata da Pfeffer (2) per indicare quella speciale proprietà che hanno gli organismi vegetali inferiori, mobili, del pari che i leucociti, di essere attratti (chimiotassi positiva), o respinti (chimiotassi negativa) da certe sostanze, capaci di esercitare su di essi un'azione chimica.

Ali Cohen ha proposto di valersi della chimiotossi positiva per raccogliere entro tubi capillari, ripieni di un liquido nu-

(1) Ali-Cohen, *Die Chemotaxis als Hülfsmittel der bacteriologischen Forschung*, Centralbl. f. Bacter. Vol. 8, 1890, p. 161.

(2) Pfeffer, *Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize*, Arbeiten a. d. botan. Institut zu Tübingen, Vol. I, 1886-88, p. 363.

tritivo, certi batterì patogeni (bacilli del tifo e del colèra), i quali si trovano commisti nei liquidi organici (feci, orine, succhi dei tessuti) con molte altre specie batteriche.

La tecnica di tale operazione consiste nel prendere tubi di vetro capillari, lunghi 2 cm., larghi 70 μ circa, saldati alla fiamma da un'estremità, e riempirli di liquido nutritivo, immergendo in questo l'estremità aperta del tubo. Il liquido adoperato di Ali-Cohen pei bacilli del tifo e del colèra è il succo fresco di patate. Si versa su di un portoggetti uno strato di paraffina, si scava in questa un rettangolo lungo 2 cm. e largo 5 mm., e vi si introduce un tubo capillare ripieno di liquido, fissandone l'estremità chiusa in uno dei lati minori del rettangolo e facendo fondere la paraffina attorno al tubo, mediante un ago riscaldato. Si riempie allora il rettangolo col liquido contenente la miscela di batterî, si copre con un vetrino coproggetti, fissandolo nella paraffina mediante una bacchetta di vetro riscaldata, che si fa scorrere lungo i margini del vetrino, e si osserva al microscopio.

Operando in tal guisa coi bacilli del tifo e del colèra contenuti nelle feci diluite o nelle acque sporche, se essi sono numerosi, già dopo pochi minuti si vedono raccolti nel tubo, ed anche se sono scarsi, se ne trova sempre qualche esemplare nel tubo, lasciando a sè il preparato per 6-24 ore. Siccome poi non sono che le specie mobili le quali hanno proprietà chimiotassiche, così si ha in ogni modo il vantaggio che quei bacilli si trovano sicuramente separati da tutti gli altri batterî non dotati di mobilità; se altre specie mobili sono penetrate con quelli nei tubi, si può poscia con maggiore facilità che dalle feci ottenere lo isolamento della specie che si vuol coltivare, diluendo il contenuto del tubo capillare nella gelatina, secondo il metodo già descritto per le culture isolanti.

La chimiotassi è adunque un mezzo non di isolamento, ma di selezione, il quale forse, perfezionato nella sua applicazione, potrà rendere utili servigî nelle ricerche batteriologiche, per quanto sia un mezzo assai delicato e quindi non facilmente applicabile per le ricerche ordinarie.

Quando si ha fra mano un materiale *puro* di cultura, ovvero sia una *cultura netta* di una data specie di microrganismi, il metodo più comune che si usa per farli moltiplicare è quello delle

b) Culture nei tubi da saggio.

Dicesi *innesto*, o *seminagione*, o *trapianto*, l'atto col quale si prende da una cultura, o dai succhi animali, o da un'altra sostanza

qualsiasi, un po' di materiale, per trasportarlo in una delle sostanze di nutrizione, preparate nei tubi, come si è detto.

Tanto la parola « innesto », come quella « seminagione, o « trapianto » si possono applicare a proposito, più l'una che l'altra, a seconda dei casi: si dà però in generale la preferenza al primo termine, perchè è quello che meglio si adatta per indicare il trasporto del materiale di cultura nei mezzi solidi di nutrizione, i quali sono adoperati più comunemente degli altri.

Per operare l'innesto delle culture si usano gli aghi di platino (Koch), o di vetro, oppure le pipette (Pasteur).

Gli *aghi di platino* sono formati, come si è detto, da un filo di platino, lungo 7-8 cm., grosso quanto basta perchè resti rigido, senza avere uno spessore soverchio (altrimenti si raffredda lentamente), il quale sta infisso nell'estremità di una bacchetta di vetro dello spessore di 5 mm. e lunga da 20 a 25 cm.

L'estremità del filo di platino può avere una conformazione diversa, a seconda dello scopo a cui deve servire: vi è l'ago di platino semplicemente diritto, il quale serve specialmente per fare l'innesto nella gelatina e nell'agar per infissione; vi è quello ripiegato ad angolo retto, il quale si adopera per la pesca delle colonie e per fare l'innesto per strisciamento, allorquando si vuole far penetrare un po' addentro nella superficie della gelatina, o delle patate, il materiale d'innesto; finalmente una terza forma di ago di platino è quello ripiegato sotto forma di *ansa*, o di piccolo *occhiello*, per poter raccogliere una quantità maggiore, una piccola goccia, di liquido infetto.

Gli *aghi di vetro* si preparano tirando alla fiamma una bacchetta di vetro, in modo da formare un prolungamento sottile di 15-20 cm. La superficie assolutamente liscia e la rigidità dell'ago di vetro lo fanno preferire a quello di platino, specialmente per le culture degli anaerobí, nelle quali interessa di non far penetrare alcuna bolla d'aria nel mezzo di nutrizione.

Le *pipette di vetro* si preparano facilmente, come gli aghi, con pezzi di tubo di vetro, dei quali un' estremità si chiude con cotone e l'altra si tira alla fiamma in tubo capillare, saldandone la punta. Queste pipette si sterilizzano a 150° C. entro una scatola di ferro, e servono pei mezzi liquidi di cultura: se ne spezza la punta con un paio di pinzette, si passa sulla fiamma, si aspira il materiale da coltivare e se ne lasciano cadere una o più goccie nel liquido nutritivo.

L'innesto cogli aghi di platino (o di vetro) nei mezzi solidi e trasparenti si fa in 2 modi: per *infissione*, o per *strisciamento*, e nei mezzi semplicemente solidi per strisciamento soltanto.

L' innesto per *infissione* si pratica nella gelatina o nell'agar, lasciate raffreddare nei tubi da saggio tenuti in posizione verticale.

Si prende il tubo nel quale si deve fare l'innesto, e si comincia dall'assicurarsi che il turacciolo non è aderente al vetro, afferrandolo con un paio di pinze e facendolo girare; si raccoglie colla punta dell'ago di platino, sterilizzato sulla fiamma e fatto raffreddare, una piccola quantità del materiale d'innesto, e poscia, tolto dal tubo il turacciolo di cotone, si infigge rapidamente l'ago nella gelatina, o nell'agar, una o più volte, si richiude il tubo e si sterilizza l' ago nuovamente. Nel far ciò bisogna usare tutte le avvertenze necessarie per impedire qualsiasi inquinamento della cultura: si terrà quindi il tubo colla sua apertura rivolta in basso (Fig. 30) e il piumacciolo di cotone fra due dita della mano sinistra, in modo che la parte sua che deve stare nell'interno del tubo non vada a contatto di nessun oggetto. Si suole anche passare rapidamente sulla fiamma il turacciolo di cotone, prima di rimetterlo nel tubo, per bruciare i germi superficiali che possono esservi caduti durante il breve tempo dell'operazione.

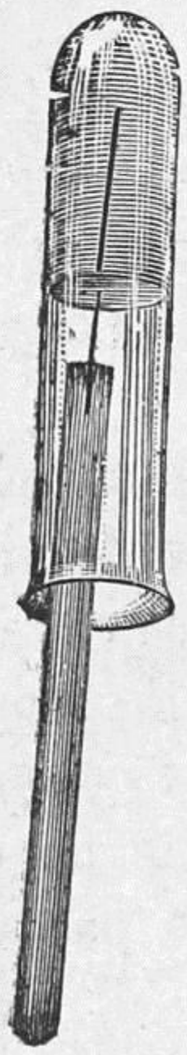


Fig. 30. — Innesto per infissione nei tubi da saggio.

La cultura per infissione costituisce la forma più comune delle culture in gelatina, ed è la più adatta per conservare al riparo da ogni impurità il materiale che si è già ottenuto allo stato di purezza, ed anche per istudiare alcune particolarità caratteristiche dello sviluppo delle specie batteriche.

Il modo di svilupparsi, ossia l'aspetto che assumono nella gelatina le varie specie di microrganismi, costituisce una delle particolarità più interessanti nello studio delle proprietà biologiche di essi. Taluni infatti producono fermenti peptici e fluidificano la gelatina, ed altri no; ed in quest'ultimo caso alcune specie si sviluppano egualmente lungo il canale d'innesto ed alla superficie della gelatina, ed altre invece soltanto lungo il canale d'innesto, oppure soltanto alla superficie, secondo il minore o maggior bisogno che hanno di ossigeno libero pel loro sviluppo. Allorquando si sviluppa sulla superficie, la colonia può assumere un aspetto diverso, di velamento, di anello, o di prominenza cerea lucente (capocchia di chiodo); e quando lo sviluppo ha luogo nell'interno, può avvenire a foggia di nastro uniforme, o sotto forma di globicini opachi, separati gli uni dagli altri, o a mo' di barbe di penna tutto attorno al canale di innesto, oppure in forma di nubecola appena visibile, come accade pel sottile bacillo della setticemia dei topi e della peste suina. Del pari che la forma, varia anche il colore delle colonie nelle specie cromogene.

Quando si ha la fluidificazione della gelatina, può questa avvenire lentamente dall'alto al basso e la colonia assumere un aspetto imbutiforme (bacillo del colèra), oppure la fluidificazione procedere a strati e più rapidamante. In tal caso, se si tratta di batterî dotati di mobilità, la gelatina fluida è opaca, e alla superficie si

forma una pellicola, altrimenti i batterî precipitano in fondo e la gelatina soprastante rimane limpida. Anche nel caso di fluidificazione della gelatina, si possono manifestare i colori più svariati.

Tutte queste particolarità offrono un grande interesse, sia perchè talune sono, fino ad un certo punto, però, caratteristiche delle singole specie e servono così pel diagnostico differenziale, e sia anche perchè si può talvolta da esse giudicare della purezza della cultura.

L'innesto *per strisciamento* si fa specialmente nell'agar e nel siero di sangue, fatti solidificare nei tubi tenuti in posizione obliqua, sotto forma di *becco di clarinetto*, e si pratica strisciando sulla superficie di queste sostanze la punta dell'ago di platino, sporca del materiale d'innesto. In tal guisa si pone a profitto una vasta estensione di superficie, e l'aspetto che assumono su di essa le colonie dei diversi microrganismi, per quanto non sia così variato come quello delle culture in gelatina, è tuttavia in certi casi abbastanza caratteristico. Questa specie d'innesto si può fare anche nella gelatina, ma soltanto colle specie non fondenti.

Le stesse norme suesposte servono per fare gli innesti negli altri mezzi di nutrizione solidi, patate, pappa di pane, ecc.

Pei liquidi si può usare l'ago di platino, o le pipette di vetro; e se si tratta di brodo contenuto nei palloncini a collo stretto, si usa prendere con un paio di pinze un piccolo pezzo di filo di platino sterilizzato, tenendolo colle pinze ad angolo retto, portarlo a contatto del materiale d'innesto e poscia, togliendo rapidamente il coperchio del palloncino, lasciarvelo cadere dentro.

Le culture nei tubi da saggio hanno l'inconveniente di non conservarsi a lungo; in parte perchè il materiale si dissecca, e in parte anche perchè viene consumato e in esso si accumulano i prodotti dello scambio materiale dei batterî, che sono a questi nocivi.

Per evitare il disseccamento, quando le culture non debbono essere conservate molto lungamente, serve la copertura colla guttaperca sottile, precedentemente bagnata nel sublimato e legata attorno al tubo; oppure si usano le *calotte di gomma*, bagnate anch'esse nella soluzione di sublimato 1 $^0/_{00}$. Anche la copertura però ha i suoi inconvenienti; giacchè se havvi sul cotone qualche germe di muffa caduto dall'aria, restando chiuso in una specie di camera umida, facilmente germoglia e si propaga nell'interno del tubo. Ad evitar ciò, si suole bagnare leggermente di sublimato l'estremità libera del piumacciolo di cotone, oppure bruciarlo sulla fiamma prima di applicare la calotta di gomma.

Ad ogni modo è bene rinnovare ogni tanti giorni le culture che si vogliono conservare capaci di sviluppo; l'intervallo di tempo, in cui

è necessario praticare una tale operazione, non si puo precisare, variando assai per le singole specie la durata della loro vitalità.

Quando si vuole non soltanto conservare la cultura, ma si vuole mantenere il materiale vivo e virulento, il mezzo migliore è quello proposto da Duclaux (1), che consiste nell'aspirare la cultura liquida, o il sangue infetto, entro tubi di vetro di 5-6 cm. di lunghezza e di 3-4 mm. di diametro, affilati alle due estremità; riempiti i tubi, se ne chiudono alla lampada gli estremi, e si tengono all'oscuro.

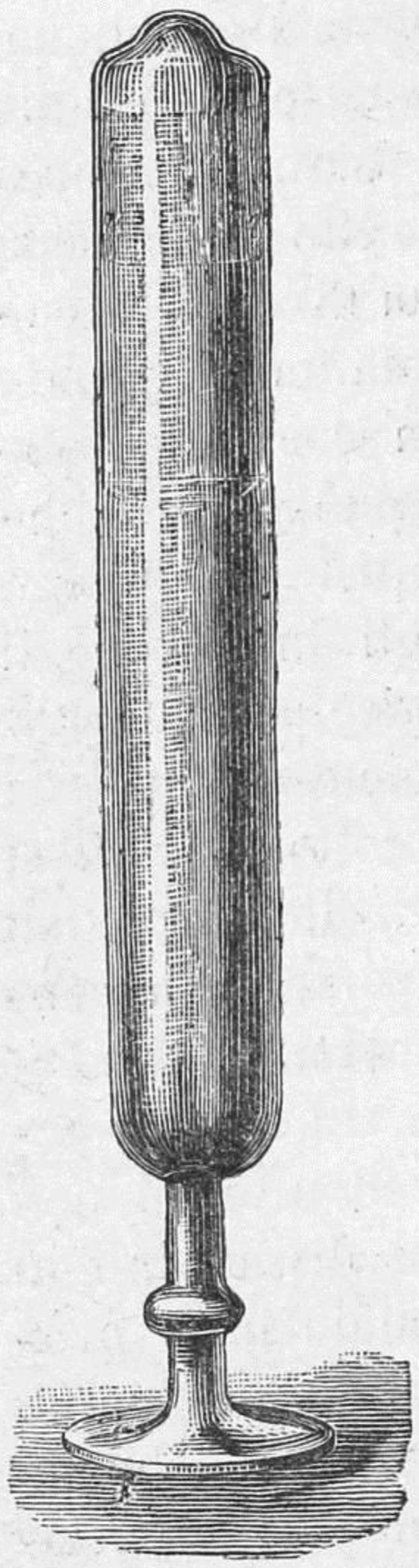


Fig. 31. — Tubo per conservare le culture.

Volendo invece semplicemente conservare le culture per le collezioni batteriologiche, che si fanno a scopo didattico, o pei musei, si possono usare, come hanno proposto Soyka e Kràl (2), le scatole doppie di vetro, chiudendone il coperchio con paraffina, dopo aver fatto sviluppare i batterî su fette di patata, o sull'agar, o sulla gelatina ivi contenuta: per le culture nei tubi da saggio si adoperano tubi speciali, muniti di piedestallo (fig. 31), dei quali si chiude alla lampada l'estremità superiore.

Per lo stesso scopo Plaut (3) consiglia di coprire le culture con uno strato di olio di oliva sterilizzato, e Prausnitz (4) di ricoprire i tubi da saggio, contenenti le culture già sviluppate, con gelatina preparata con acqua semplice, a cui si è aggiunto il 5 % di acido acetico o l'1 % di acido fenico. Quest'ultimo mezzo avrebbe il vantaggio di conservare anche le culture dei batterî fluidificanti la gelatina. Volendo però in seguito adoperare ancora le culture, serve meglio l'espediente suggerito da Czaplewski (5), che consiste nello spingere un poco in dentro nei tubi da saggio il turacciolo di cotone, e versarvi sopra la paraffina dura, fusa, la quale chiude così l'ingresso all'aria, e si può anche facilmente rimuovere a volontà, immergendo nella paraffina un piccolo cavaturaccioli e riscaldando leggermente sulla fiamma l'estremità del tubo da saggio.

(1) Duclaux, *Sur la conservation des microbes*, Annales de l'Institut Pasteur, 1889, p. 78.

(2) Lavoro citato.

(3) Plaut, *Zur Conservirungstechnik*, Centralblatt f. Bakteriologie, Vol. V, 1889. p. 324.

(4) Prausnitz, Lavoro citato p. 131.

(5) Czaplewski, *Zur Anlage bacteriologischer Museen*, Centrabl. f. Bacteriologie, Vol. VI. 1889 p. 409.

c) Culture anaerobiche.

Riuniamo in un capitolo a sè tutto ciò che è relativo alla coltivazione di quei microrganismi, che si sviluppano soltanto in mezzi privi di ossigeno libero, e che sono detti perciò *anaerobî*, giacchè la tecnica di tali culture è affatto speciale, ed assai più complicata di quella già esposta per le culture ordinarie, in presenza dell'aria.

I mezzi proposti per togliere dai recipienti e dai mezzi di cultura l'ossigeno atmosferico sono di vario genere:

a) Con alcuni di essi si cerca di fare assorbire l'ossigeno da agenti chimici avidi di questo gas, oppure da microrganismi aerobî, che si seminano nello stesso mezzo di cultura.

b) Si scaccia coll' ebollizione l'O. dal mezzo nutritivo, mediante il vapor d'acqua che se ne svolge, e si ricopre poscia ii mezzo con uno strato di sostanza solida (mica, agar), o di liquido (vaselina, olio).

c) Si sostituisce l'aria del recipiente con un altro gas indifferente, non tossico, cioè, pei microrganismi, il quale si fa pure gorgogliare attraverso il mezzo di nutrizione.

d) Si toglie l'aria mediante una pompa pneumatica, ad acqua o a mercurio.

e) Si combinano questi due ultimi mezzi, togliendo l'aria colla pompa e sostituendola con un gas indifferente.

Tutti questi mezzi sono stati applicati con metodi diversi, dei quali, come di solito, descriveremo soltanto quelli che raggiungono meglio lo scopo e colla maggiore semplicità, premettendo fin d'ora che con nessuno dei metodi proposti si riesce a fare scomparire completamente l'O. dai recipienti di cultura, senza che però la piccola quantità di quel gas che rimane, usando i mezzi che appunto diciamo migliori, serva ad impedire lo sviluppo delle specie più strettamente anaerobiche.

Per riconoscere intanto se la quantità di O. rimasto non supera il limite in cui riesce indifferente, abbiamo a nostra disposizione un mezzo assai semplice, che consiste nel mescolare alla sostanza nutritiva alcalina, contenente glucosio all'1 $^0/_0$, alcune goccie di una soluzione acquosa di indigotina, fino ad avere una colorazione azzurra, ben netta; facendo bollire per pochi momenti la sostanza nutritiva così preparata, il colore azzurro scompare, perchè il glucosio riduce l'indaco azzurro in indaco bianco, e ricompare invece appena viene di nuovo in contatto di quantità sensibili di O. Se adunque, dopo avere applicato uno dei metodi di cui ora

faremo la descrizione, il mezzo di nutrizione resta incoloro, ciò vuol dire che lo scopo di eliminare l'O. è raggiunto, cosicchè una tale esperienza serve di controllo per la bontà del metodo stesso.

Come l'indigotina, anche il ferrocianuro di ferro ha la stessa proprietà, di restar bianco finchè è lontano dall'O. e di diventare azzurro non appena si trova in presenza anche di piccole traccie di quel gas.

Ricordiamo inoltre che lo sviluppo degli anaerobî viene favorito dall'aggiunta ai mezzi solidi di nutrizione di sostanze riducenti, le quali assorbono l'O libero che si può trovare in esse. Si può usare per tale scopo il glucosio 1-2 % (Liborius), oppure, come hanno proposto Kitasato e Weyl (1), la resorcina 0,1 %, il formiato di soda 0,5 % e il solfoindigotato di soda (carmino-indaco del commercio) 0,1 % (secondo Braatz 1 su 6-7000). Alcuni microrganismi anaerobî si sviluppano nell'agar colorata col carmino-indaco, anche facendo le culture per infissione nei tubi alla maniera ordinaria: si vede allora l'agar diventare incolora per tutto il tratto in cui avviene lo sviluppo, ossia fino a 2 cm. circa al disotto della superficie, mentre il resto conserva il suo colore primitivo.

Per la descrizione dei metodi di cultura anaerobica seguiremo la stessa via già tenuta per i metodi ordinarî, esponendo prima quelli destinati allo isolamento delle specie anaerobiche, per ottenerle in cultura pura, e poscia quelli destinati a riprodurre le culture e a studiarle col microscopio mediante le goccie pendenti.

Quanto ai *metodi di isolamento degli anaerobî*, limitandoci a parlare di quelli in cui entra l'uso delle sostanze di nutrizione solide e trasparenti, il primo di tali metodi è quello usato da Koch fino dal 1884 (2), che consiste nel ricoprire con una lamina sottile di mica, sterilizzata, la gelatina seminata e distesa sulle lastre di vetro col metodo ordinario di Koch, chiudendo lateralmente l'ingresso all'aria mediante la paraffina liquefatta, versata tutto intorno alla lamina di mica.

Questo metodo però, così semplice, non raggiunge completamente lo scopo, ed oggidì più non si usa, essendovene altri molto migliori.

Fra questi annoveriamo anzitutto il metodo di Hesse e di Liborius (3), che consiste nel fare le culture nella gelatina, o

(1) Kitasato u. Weyl, *Zur Kenntniss der Anaëroben*, Zeitschr. f. Hygiene vol. VIII p. 41 e 404.

(2) Berl. klin, Wochenschr., N°. 31.

(3) Liborius, *Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoffbedürfnisses der Bacterien*, Zeitschr. f. Hygiene Vol. I. 1887. p. 115.

nell'agar, disposte a strati molto alti nei tubi da saggio. Si versa in questi la sostanza nutritiva per un'altezza di 10-20 cm., si fa bollire per iscacciare l'aria e l'O, ivi contenuti, e si fa poscia raffreddare rapidamente, fino ad una temperatura molto prossima al suo punto di solidificazione. Si fa allora l'innesto del materiale, mediante un ago di platino lungo e robusto, operando collo stesso ago la miscela del materiale nella gelatina, o nell'agar, che si fa poscia solidificare rapidamente nell'acqua ghiacciata, tenendo il tubo verticale. Se il materiale è ricco di germi, si ripete egualmente la diluzione dal 1.° tubo in un 2.°, od anche in un 3.°, nella maniera già descritta pel metodo delle culture isolanti di Koch. In tal guisa si ottiene che negli strati più profondi del mezzo nutritivo non penetri O, o per lo meno non in tale quantità, da impedire che in essi avvenga lo sviluppo degli anaerobî, come infatti si verifica.

Un tal metodo, oltre il pregio di una grande semplicità, ha pure quello di mettere in evidenza il diverso grado di affinità che hanno per l'ossigeno le varie specie di microrganismi contenuti nella miscela, giacchè si vedono nei tubi, così preparati, le colonie degli aerobì assoluti svilupparsi soltanto negli strati piu superficiali, quelle degli anaerobì facoltativi distribuirsi uniformemente nello spessore del mezzo, e quelle degli anaerobî assoluti, invece, crescere soltanto negli strati più profondi. Esso ha però non pochi difetti, fra i quali assai grave quello della impossibilità dell'esame microscopico delle colonie sviluppate in tali tubi, e della difficoltà grandissima che si incontra nel fare il trapianto di ogni singola colonia isolata, necessario per riprodurle in altrettante culture pure.

Per tale scopo il mezzo migliore è quello di rompere il tubo, dopo averne sterilizzata la superficie, raccogliere il cilindro di agar, o di gelatina, entro una capsula di vetro sterilizzata, e tagliarlo con istromenti sterilizzati, per andare alla pesca delle singole colonie. In tutte queste manipolazioni, però, è facile comprendere come difficilmente si riesce a prendere il materiale puro da una sola colonia, senza che resti inquinato da quelle vicine.

Lo stesso difetto ora enunciato è inerente anche al metodo proposto da Esmarch, il quale consiste nel riempire di gelatina, bollita e fatta raffreddare a 25° C., lo spazio interno del tubo, sulla cui superficie si è distesa in precedenza la gelatina, contenente i germi, col mezzo del rotolamento nell'acqua ghiacciata. Volendo adoperare questo metodo, bisogna avere l'avvertenza di tenere immerso il tubo nell'acqua ghiacciata, mentre vi si versa entro la gelatina fusa, per impedire che questa sciolga lo strato aderente alle pareti.

Si possono invece usare con vantaggio per l'isolamento degli

anaerobî le colture arrotolate alla Esmarch, assorbendo però con mezzi chimici l'O dell'aria contenuta nel recipiente, secondo il metodo proposto da Buchner, oppure sostituendo in esso l'aria con un gas indifferente, secondo il metodo di Fränkel.

Il *metodo di Buchner* (1) consiste nel mettere il tubo, nel quale si è fatta la cultura arrotolata, entro un tubo più grande, lungo 22-24 cm. e largo 3, nel fondo del quale si è introdotto 1 gr. d'acido pirogallico e 10 cc. di una soluzione di potassa caustica al 10 %. Entro questo tubo havvi un piccolo sostegno di rete metallica (Fig. 32) per sorreggere il tubo di cultura. L'orificio di questo deve essere chiuso debolmente dal tappo di cotone, mentre quello del tubo esterno si chiude ermeticamente con un tappo di gomma. Dopo 24 ore l'O è quasi completamente assorbito, e non resta nell'interno che un' atmosfera composta di azoto, d'anidride carbonica e di piccole traccie di ossido di carbonio.

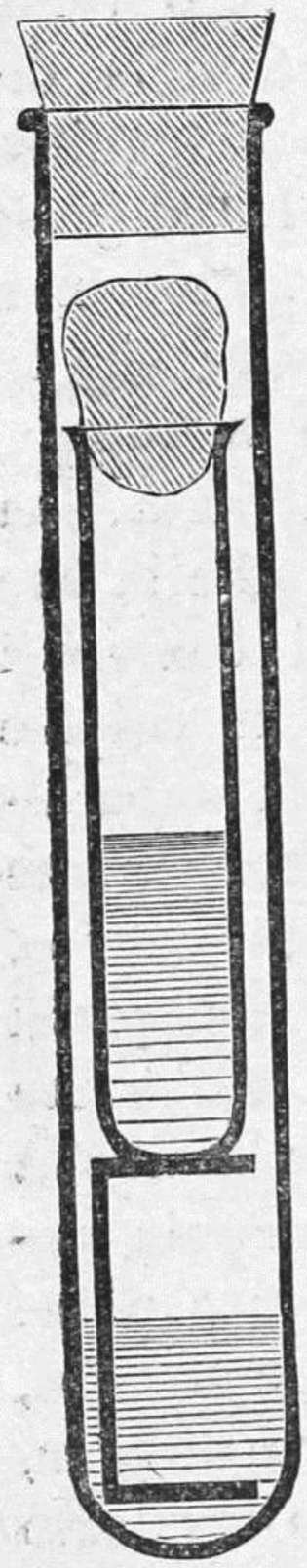


Fig. 32. — Tubo di Buchner per le culture anaerobiche.

Questo metodo, che del resto sarebbe semplice e spiccio abbastanza, ha anzitutto l'inconveniente di non escludere assolutamente la presenza dell' O, ed oltre a ciò ha pure il difetto che nelle prime 24 ore lo sviluppo dei microrganismi introdotti nella gelatina, o nell'agar, ha luogo in presenza dell'ossigeno, il che è specialmente da evitarsi, allorquando si tratta di culture isolanti: nè vale il mezzo suggerito da Hueppe (2), di lasciare i recipienti al freddo per 24 ore, prima di esporli alla temperatura adatta per lo sviluppo dei germi, giacchè, secondo lo stesso Buchner, il freddo rallenta assai l'assorbimento dell'O.

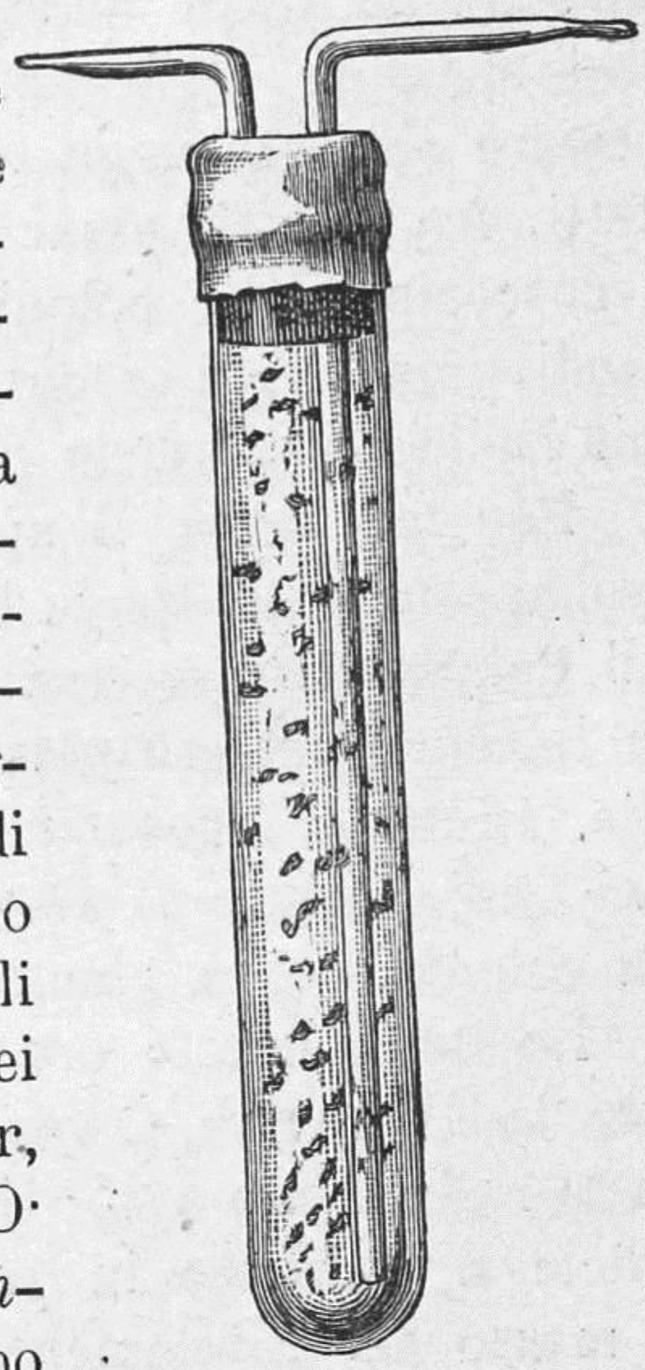


Fig. 33. — Tubo di Fränkel per le culture anaerobiche

Migliore invece è il *metodo di Fränkel* (3), secondo il quale l'aria nel tubo viene sostituita dall'idrogeno, che si fa gor-

(1) Buchner, *Eine neue Methode zur Kultur anaërober Mikroorganismen*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. IV. 1888, p. 149.
(2) Opera citata, pag. 358.
(3) Fränkel, *Ueber di Kultur anaërober Mikroorganismen*, Centralbl. f. Bakteriologie Vol. III. 1888. p. 735.

gogliare attraverso il mezzo di nutrizione ed al tubo che lo contiene. Per far ciò si adoperano tubi a pareti sottili, piuttosto larghi e senza bordo sporgente dall'orificio; si fa in questi la distribuzione del materiale di cultura, facendo una o più diluzioni, secondo il caso, e poscia si sostituisce in essi rapidamente il turacciolo di cotone con un tappo di gomma munito di due fori, destinati a dar passaggio a due tubi di vetro ripiegati ad angolo retto nella parte esterna, dei quali uno arriva fino al fondo del tubo, e l'altro invece si arresta poco al di sotto del tappo (Fig. 33).

Le branche orizzontali dei due tubi hanno un piccolo strozzamento nel loro decorso, ed oltre a ciò, quella del tubo più lungo ha nel suo interno un batuffolo di cotone, destinato a filtrare l'idrogeno, prima che questo vada a gorgogliare attraverso al mezzo di nutrizione.

Il tappo, munito dei tubi di vetro, si fa sterilizzare nella corrente di vapor d'acqua, e dopo di averlo introdotto nel tubo di cultura, si ricopre di paraffina dura, specialmente nei punti dove esso è attraversato dai tubi di vetro e tutto attorno al margine del tubo di cultura, per impedire l'ingresso dell'aria.

L'estremità esterna del tubo più lungo si mette in comunicazione, per mezzo di un tubo di gomma, con un apparecchio generatore di idrogeno (di Kipp, o di Kekulè) ad acido solforico e zinco, interponendo fra esso e il tubo di cultura una o più bottiglie di lavamento, a seconda che per ottenere l'H si adoperano prodotti puri o prodotti commerciali.

È bene esporre alcuni particolari sulla preparazione dell'H, giacchè da essi può talvolta dipendere la riuscita dell'operazione. Anzitutto è a dirsi che è preferibile, quando si può, adoperare lo zinco e l'acido solforico *allo stato di purezza*, non essendo il loro costo molto elevato; ed in tal caso non vi ha bisogno che di una sola bottiglia di lavamento, contenente una soluzione di acido pirogallico (10 %) con potassa caustica (10 %), per assorbire qualsiasi traccia di O: se invece si adoperano gli stessi prodotti, commerciali, allora è necessario far passare prima l'H attraverso una soluzione di acetato di piombo al 10 % per trattenere l'acido solfidrico, poscia attraverso una soluzione di nitrato d'argento, pure al 10 %, per privarlo dell'idrogeno arsenicale, e finalmente attraverso la soluzione alcalina di acido pirogallico per eliminare l'O.

È necessario infine lasciar funzionare per un po' di tempo l'apparecchio *in bianco*, come suol dirsi, ossia lasciare sfuggire una certa quantità di H, prima di metterlo in comunicazione colla provetta nella quale deve scacciarsi l'aria, per essere sicuri di introdurre H puro.

L'H gorgoglia attraverso il mezzo di nutrizione mediante il tubo che è immerso in esso fino al fondo del tubo, e fuoriesce dal tubo più corto: se si tratta di gelatina, si tiene durante l'opera-

zione il tubo immerso nell'acqua riscaldata a 35° C., e se si tratta di agar nell'acqua a 40°-42° C. Il passaggio della corrente di H deve durare almeno da 15 a 20 minuti, perchè tutta l'aria venga scacciata dal tubo. Si saldano poscia colla fiamma, prima il tubo corto e quindi quello più lungo, nel punto strozzato, e si imprime finalmente al tubo di cultura un movimento di rotazione attorno all'asse maggiore, per distribuire la sostanza di nutrizione sulla superficie interna di esso, tenendolo immerso nell'acqua fredda, se contiene gelatina, oppure nell'aria se vi è l'agar. In quest'ultimo caso è necessario far passare rapidamente una corrente forte di H, perchè l'agar facilmente si rapprende.

Si adopera l'H invece dell'anidride carbonica, o di un altro gas, perchè il primo soltanto, almeno secondo le esperienze fatte finora, riesce indifferente per lo sviluppo dei batterî.

Invece dei tubi da saggio si possono adoperare le boccette di Erlenmeyer (Hueppe), od altri recipienti consimili a fondo largo e piatto, lasciando solidificare dopo l'operazione la gelatina o l'agar sul fondo di essi.

Questo metodo di Fränkel ha il vantaggio di essere poco costoso e di non richiedere l'uso di apparecchi, che non tutti i laboratorî posseggono, quali sono le pompe a mercurio, o ad acqua, che si adoperano per l'estrazione dell' aria, secondo altri processi. Non si può dire però che sia scevro di inconvenienti, giacchè anzitutto non è assolutamente accertato che l' H sia un gas indifferente per tutti i batterî anaerobî, e che esso non possa forse modificare la composizione del mezzo nutritivo, ed oltre a ciò vi è sempre il difetto inerente alle culture arrotolate, relativo alla difficoltà dell'esame e della pesca delle colonie che vi si sviluppano.

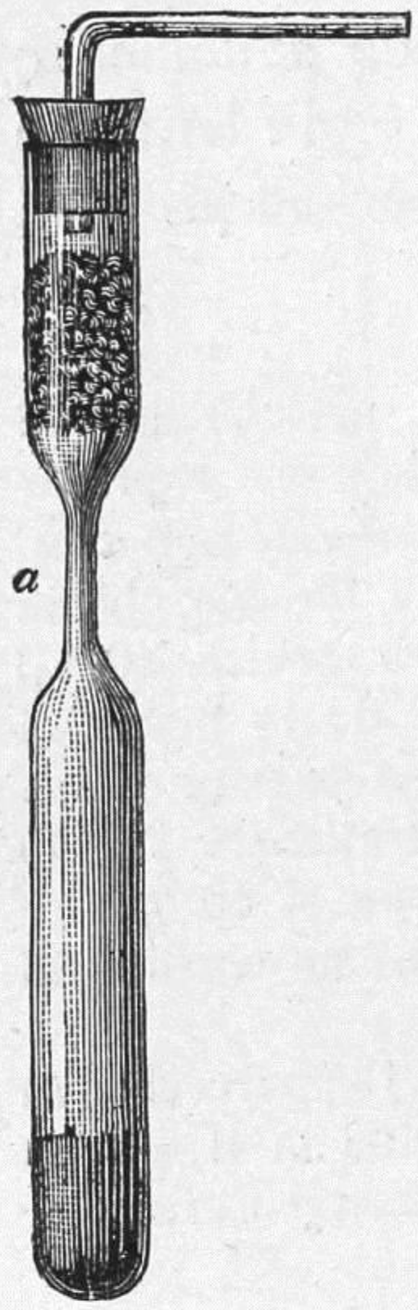


Fig. 34. — Tubo di Gruber per le culture anaerobiche.

È per ciò che migliore di tutti quelli esposti finora è il *metodo di Gruber* (1), per quanto esso richieda l'uso della pompa per estrarre l'aria dal tubo di cultura. Si prendono tubi da saggio più lunghi dell'ordinario, o meglio, avendo a disposizione un mantice per soffiare il vetro, si preparano tubi aventi la forma rappresentata dalla fig. 34, prendendo un tubo di vetro facilmente fusibile, largo 2 cm., e dividendolo in tratti lunghi 20-22 cm., i quali si chiudono ad una delle estremità in forma rotonda. A ciascuno di questi tubi si fa colla fiamma un collo (a), lungo 5 cm. e largo 3-4

(1) Gruber, *Eine Methode der Cultur anaërobischer Bacterien*, Centralbl. f. Bacteriologie Vol. I, 1887, p. 367

mm., in modo che il tubo misuri 15 cm. di lunghezza dal fondo al principio del collo, e resti ancora al di sopra di questo un tratto di tubo lungo 5 cm. circa, il quale si chiude con un turacciolo di cotone. Questi tubi si sterilizzano come d'ordinario, e in essi si introducono, mediante un imbuto ad estremità sottile, 10 cc. di gelatina, o di agar, preparate col glucosio (1 %), e 2 cc. di acqua distillata e sterilizzata, che deve sopperire alla perdita d'acqua dovuta all'evaporazione che succede nel fare il vuoto.

Per fare la coltura anaerobica, si discioglie la gelatina, o l'agar, si introduce in questa il materiale di cultura, mediante un lungo ago di platino, si spinge in dentro nel tubo il piumacciolo d'ovatta e sopra questo si applica un tappo di gomma provvisto di un tubo di vetro, ripiegato ad angolo ed aperto ad ambe le estremità.

L'estremità esterna di questo tubo si mette in comunicazione con una pompa a mercurio o ad acqua, e mentre si estrae l'aria, la parte del tubo di cultura sottostante al collo si tiene immersa nell'acqua calda a 35° (gelatina) o a 42° C. (agar), perchè in tal modo queste sostanze, facendo il vuoto nel tubo, entrano in ebollizione, il che rende più completa l'estrazione dell'aria dal recipiente. Per evitare che la schiuma, che si forma abbondante in principio dell'operazione, finchè v'è aria nel tubo, vada ad imbrattare il turacciolo di cotone, basta riscaldare leggermente, di quando in quando, con una fiamma di gas la parte del tubo vicina al collo. Si continua a fare il vuoto per 15-20 minuti, finchè si vede che, in luogo della schiuma a bolle fine, si formano sul liquido grosse bolle che scoppiano appena formate, e si riscalda allora il collo del tubo colla fiamma del gas, per saldarlo; il che avviene facilmente, giacchè il vetro rammollito si schiaccia per opera della pressione atmosferica esterna. Fatto ciò, si fa solidificare la gelatina o l'agar sulla superficie interna del tubo, alla Esmarch, come già più volte si è detto.

Questo metodo è più esatto degli altri, giacchè in esso è sicura l'esclusione dell' O, senza che vi sia il pericolo che un altro gas eserciti azione nociva sui microrganismi che si devono sviluppare, giacchè lo spazio interno del tubo, avendo l'avvertenza di fare solidificare lentamente l'agar, o la gelatina, resta riempito di vapore acqueo. Con questo metodo si ha inoltre il vantaggio di potere studiare, quando interessa, i gas che si producono per lo sviluppo degli anaerobî coltivati.

Contemporaneamente a Gruber, anche Roux (1) ha descritto

(1) Roux. *Sur la culture des microbes anaèrobies*, Annales de l'Institut Pasteur 1887. Vol. I. pag, 49.

un processo analogo, adoperando tubi lunghi 25-30 cm. e larghi 3, muniti di un collo strozzato, anche più semplici di quelli di Gruber.

In luogo dei tubi si possono adoperare egualmente le boccette piatte, a pareti parallele, di cui il collo è munito di strozzamento, come quello dei tubi ora descritti.

Rinunciamo a descrivere altri metodi congeneri, i quali sono più complicati, o richiedono l'uso di recipienti speciali costosi.

Tutti i processi finora descritti servono però meglio per ottenere semplicemente la moltiplicazione dei batterî anaerobî già isolati, anzichè per ottenerne lo isolamento, giacchè hanno tutti in comune il difetto, già più volte enunciato, della difficoltà della pesca delle colonie.

Perciò il mezzo migliore per fare le culture isolanti degli anaerobî è quello di disporre le lastre di vetro, o le scatole di Petri (senza coperchio), sulle quali si è disteso il materiale di nutrizione, contenente i germi già distribuiti, entro una campana doppia di vetro, nella quale si pratica il vuoto, o si sostituisce l'aria con un gas indifferente, o finalmente si combinano insieme,

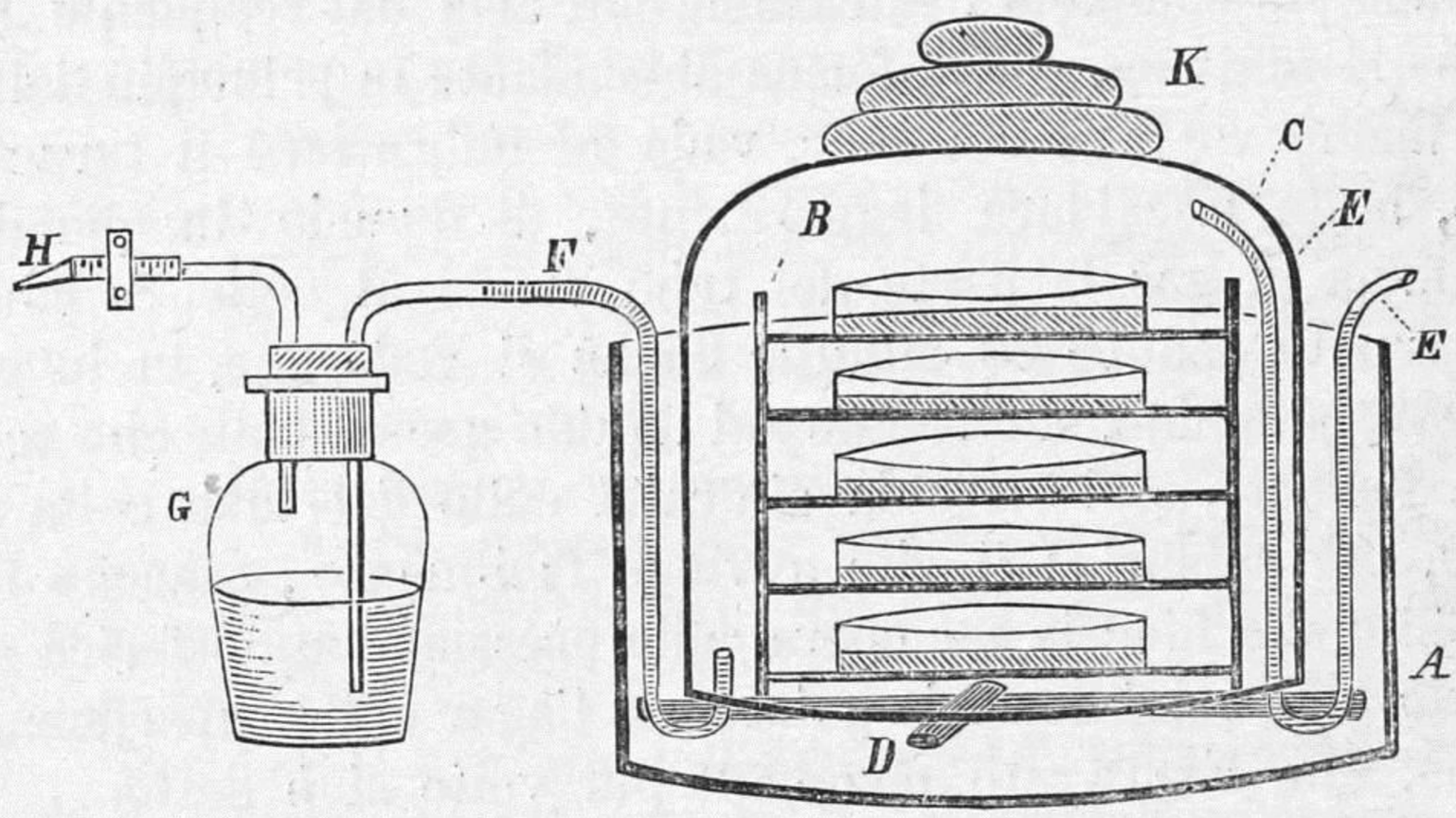


Fig. 35. — Apparecchio di Botkin per le culture anaerobiche isolanti.

come ha usato prima Pasteur, l'azione del vuoto e la sostituzione di un gas indifferente.

L'apparecchio avente la disposizione più adatta per tale scopo è quello descritto da Botkin (1), il quale (fig. 35) consiste in un cristallizzatore di vetro (A) largo da 20 a 25 cm., contenente un sostegno di rete metallica (B), a ripiani, destinati a sostenere quattro scatole di Petri, che resta coperto da una campana di vetro (C) avente un diametro 2-3 cm. più piccolo di quello del

(1) Botkin. *Eine einfache Methode zur Isolirung anaërober Bacterien*, Zeitschr. f. Hygiene. Vol. IX. 1890. p. 383.

cristallizzatore che la contiene. Questa campana non poggia direttamente sul fondo del cristallizzatore, ma poggia sopra un tubo di piombo schiacciato (D) disposto in croce: resta così fra il fondo di quello e la campana soprastante un certo spazio, attraverso il quale si fanno passare due tubi di gomma elastica ripiegati ad U, aventi nel loro interno un mandrino di fil di rame, pieghevole e sottile, il quale fa sì che si possa dare al tubo di gomma la forma che si vuole, senza che resti schiacciato. Uno di questi tubi (E) va nell'interno della campana fino al disopra delle scatole Petri, e l'altro (F) invece si arresta poco sopra al margine della campana stessa. Il tubo E si mette in comunicazione coll'apparecchio generatore dell'idrogeno, e l'altro serve per dar esito all'aria ed al gas, e per stabilire in pari tempo il momento in cui coll'H non fuoriesce più O, mediante l'accensione del gas fuoruscente. Ad evitare il pericolo dello scoppio della campana durante tali prove, basta interporre una piccola bottiglia di lavamento (G), della capacità di 50 cc., a metà ripiena d'acqua, in cui il tubo di efflusso del gas termina in punta sottile (H), in modo da potere impunemente accendere l'idrogeno che ne fuoriesce.

Per adoperare l'apparecchio, dopo averlo sterilizzato nella maniera ordinaria, si dispongono nel sostegno le scatole di Petri, senza coperchio, contenenti il materiale di cultura, e al di sotto di esse si pone una quinta scatola con una soluzione concentrata, alcalina, di acido pirogallico, destinata ad assorbire qualsiasi traccia residua di O. Fatto ciò, si depone la campana sul tubo di piombo, si mettono a posto i tubi di gomma, e si chiude l'interstizio fra la campana e il cristallizzatore mediante uno strato di *paraffina liquida*, alto 3 cm. circa. Si mette allora in comunicazione il tubo E coll'apparecchio generatore d'idrogeno, munito delle solite bottiglie di lavamento, e si chiude con una pinza a pressione il tubo di efflusso H. In tal modo cresce la pressione del gas nell'interno della campana, finchè vince la resistenza della paraffina liquida e fuoriesce gorgogliando attraverso di essa. Si lascia gorgogliare in tal guisa per 20-30 minuti, si apre il tubo H, accendendo il gas che ne esce, dopo passato un certo tempo necessario all'espulsione dell'aria della bottiglia. Se il gas brucia in maniera non interrotta e senza rumore, segno è che non contiene più traccia di O, e se invece scoppietta, si chiude di nuovo il tubo colla pinza a pressione, e si ripete per altri 20 minuti l'operazione sopra descritta. Quando si è sicuri che tutto l'O è stato scacciato della campana, si estraggono cautamente da questa i due tubi di gomma, e si mette l'apparecchio nel termostato, oppure si lascia alla temperatura dell'ambiente, a seconda dei casi.

Perchè la campana sia più pesante e non venga smossa dal gas che vi si raccoglie sotto pressione, si può mettere attorno al perno, di cui è provvista, uno o due giri di tubo di piombo (K).

Si può mantenere la stessa disposizione dell'apparecchio, adoperando però, come io stesso usava già da tempo, una campana avente alla sua sommità un foro, nel quale si adatta un tappo di gomma con due tubi di vetro, come pel metodo Fränkel, e facendo passare per mezzo di questi tubi la corrente d'idrogeno attraverso la campana. Se si chiude l'interstizio fra la campana e il cristallizzatore con paraffina dura, si può anche alternare l'azione del vuoto, mediante la pompa, con quella della corrente d'idrogeno, per estrarre con sicurezza qualsiasi traccia di O dallo spazio interno.

Si comprende facilmente come questi metodi, che permettono l'uso delle scatole o delle lastre di vetro, sieno superiori a quelli in cui si adoperano i tubi da saggio, od altri recipienti, per le culture anaerobiche come per quelle aerobiche ordinarie (1).

Per le *culture anaerobiche nei tubi da saggio*, allorquando, cioè, si tratta di ottenere semplicemente la moltiplicazione del materiale ottenuto allo stato di purezza, servono appunto alcuni dei metodi già esposti, e dimostrati deficienti sotto qualche riguardo per le culture isolanti.

Infatti il metodo così semplice delle culture nei mezzi solidi in strati alti, privati dell'aria mediante l'ebollizione, serve assai bene per le culture anaerobiche nei tubi da saggio. Si fa bollire cautamente sopra la fiamma la gelatina, o l'agar, la si fa raffreddare rapidamente nell'acqua ghiacciata, e dopo avervi praticato l'innesto per infissione, vi si versa sopra uno strato alto 2-3 cm. di gelatina, o di agar, che mantiene la cultura al riparo dall'aria.

Il metodo di Gruber e di Roux, e quello di Fränkel si applicano nella maniera già esposta, colla sola variante, che dopo aver estratto l'aria dal mezzo di nutrizione, oppure dopo avervi fatto gorgogliare l'H, si fa solidificare il mezzo rapidamente, si fa l'innesto e si ripete poscia l'operazione dell'estrazione dell'aria, o del passaggio dell'H, nello spazio interno del tubo, soprastante alla cultura. Applicando questi metodi, si può anche fare l'innesto per strisciamento: basta lasciare raffreddare l'agar e la gelatina in posizione obliqua.

(1) Per le culture isolanti dei batterî anaerobî possono anche adoperarsi piccoli recipienti portatili, appositamente costrutti, come sono quelli proposti da Kitasato (*Zeitschr. f. Hygiene*, Vol. 7, 1889, pag. 227), e da Roth (*Centralbl. f. Bacteriologie*, Vol. 13, 1893, pag. 224).

Se si tratta di culture nel siero di sangue, o sulle patate, non si ha che praticare il vuoto nei tubi, dopo aver fatto l'innesto nel mezzo nutritivo che vi è contenuto.

Per le culture anaerobiche sulle patate, Roux ha proposto di aggiungere ai tubi speciali, da lui usati per contenere le patate, un'appendice laterale, tubulare, innestata nel tubo al di sotto dello strozzamento, la quale serve per mettere il tubo in comunicazione colla pompa. Si può però, senza adoperare tali tubi, che costano più cari degli ordinarî, applicare il metodo di Gruber, o quello di Fränkel alle culture fatte nei tubi semplici, aventi un pezzo di vetro nel fondo (Günther).

Un mezzo assai spiccio di cultura anaerobica è stato suggerito da Fuchs (1), e consiste nel far passare la corrente di H nel tubo di cultura, nel quale si è già fatto l'innesto, *tenuto rivolto a-l'ingiù*, e nel turare poscia rapidamente il tubo con un tappo di gomma, chiudendo questo ermeticamente colla paraffina.

Questo stesso metodo è stato reso anche più semplice da Blücher (2), il quale ha proposto di capovolgere il tubo in cui si è fatto l'innesto, senza il tampone d'ovatta, entro un bicchiere a metà pieno di acqua, o di glicerina molto diluita, e nel far passare attraverso di esso, mediante un tubo di vetro piegato ad U, una corrente di H per 5 minuti. Fatto ciò, si estrae il tubo di vetro, e si lascia il tubo da saggio entro il bicchiere, immerso nell'acqua.

Va ricordato finalmente il metodo semplicissimo e comodo di cultura anaerobica, proposto da Hueppe, nelle *uova crude*, fresche e non fecondate. Dopo avere sterilizzato la superficie esterna dell'uovo, lavandola con sublimato, con alcool e con acqua sterilizzata, si asciuga con carta o cotone sterilizzato, si pratica nel guscio, nella sua estremità più acuta, un piccolo foro mediante un ferro arroventato, e attraverso di esso si introduce nell'uovo coll'ago di platino, o in altro modo, il materiale da cultura, ricoprendo il foro con una goccia di ceralacca, e rivestendo anche le uova di uno strato impermeabile di silicato potassico, quando si debbono tenere molti giorni nel termostato. Le piccole traccie di O che si trovano nell'interno dell'uovo vengono presto consumate dalle sostanze riducenti gazose, prodotte dallo sviluppo dei batterî, e si ottiene così senza alcuna preparazione uno spazio anaerobico, bene adatto per questo genere di culture (3).

(1) Fuchs, *Ein anaërober Eiterungserreger*, Inaug. Dissert. Greisswald, 1890, Riassunto nel Centralbl. f. Bacter. Vol. VII, p. 11.

(2) Blücher, *Eine Methode zur Plattencultur anaërober Bacterien*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 8°, 1890, p. 505.

(3) Nell'adoperare le uova crude per le culture, bisogna por mente al fatto che

Per le culture nei liquidi servono perfettamente gli stessi metodi sovraesposti, senza bisogno di adoperare recipienti di forma speciale, come sono i *tubi a forchetta*, usati prima da Pasteur e da Roux per le culture anaerobiche nel brodo.

Una delle caratteristiche dello sviluppo dei batterî anaerobî è la produzione di gas da cui è accompagnato; sviluppo di gas che nei mezzi liquidi si manifesta sotto forma di spuma, e in quelli solidi sotto forma di fenditure che rompono l'unità del mezzo di nutrizione. Quando si vogliono studiare tali gas, i quali finora sono imperfettamente conosciuti, si possono estrarre e raccogliere dai recipienti di cultura mediante la stessa pompa che serve per fare il vuoto. Si possono però adoperare per lo stesso scopo anche apparecchi speciali, come sono quelli usati da Pasteur e da Nencki, oppure, come ha proposto Smith (1), quei matracci che servono per la determinazione dello zucchero nelle orine. —

Volendo seguire coll' osservazione microscopica lo sviluppo degli anaerobî nelle *goccie sospese*, si può applicare il metodo seguente, suggerito da Nikiforoff (2). Si spalma dapprima con vaselina il margine dell'incavo del portoggetti, e su questo si applica il coproggetti colla goccia, provvista del materiale di cultura, in modo che resti da una parte un piccolo spazio aperto fra il coproggetti e l'incavo. In questo spazio si depone una goccia di soluzione concentrata di acido pirogallico, la quale si dispone per capillarità tutto intorno all'incavo; si fa strisciare allora il portoggetti verso il lato dove si è deposta la goccia, in modo da lasciare aperto di nuovo un piccolo spazio dalla parte opposta, e quivi si depone una goccia di soluzione di potassa caustica, mettendo poscia il coproggetti nella posizione dovuta, in guisa da coprire tutto l'incavo del portoggetti. I due liquidi si mescolano senza toccare la goccia, e l'acido pirogallico assorbe l'O contenuto nello spazio interno, assumendo un colorito oscuro.

Questo metodo, abbastanza semplice, ha l'inconveniente di non potere essere applicato per le culture da tenersi a 37° C., giacchè, quando tali preparati si portano alla temperatura dell' ambiente per osservarli, si condensa il vapor d'acqua sulla superficie interna del coproggetti, e si determina così il mescolarsi dell'acido pirogallico colla cultura.

nell' interno delle uova, specialmente se conservate da qualche tempo, si possono trovare microrganismi, giacchè tanto il guscio esterno, come la pellicola interna dell'uovo, sono permeabili pei batterî, come fu dimostrato da Schrank e da Zörkendörfer (*Archiv. f. Hygiene*, Vol. 16, 1893, pag. 369).

(1) Smith, *Das Gährungskölbchen in der Bacteriologie*, Centralbl. f. Bacteriologie Vol. VII. 1890. p. 502.

(2) Nikiforoff, *Ein Beitrag zur den Culturmethoden der Anaëroben*. Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 8. 1890. p. 489.

Volendo tenere adunque siffatte culture a 37°, bisogna adoperare portoggetti speciali, come è quello proposto da Braatz (1), che permette non solo di usare l'acido pirogallico, per l'assorbimento dell'O, in proporzione molto maggiore che col metodo di Nikiforoff, ma permette anche di tenere la goccia sospesa in un atmosfera di H, evitando così l'inconveniente della perdita di acqua, che subisce il mezzo di nutrizione per opera dell'acido pirogallico.

Dopo quanto si è esposto finora, non è più il caso di parlare dell'uso, proposto da Roux, di batterî molto avidi di O, per assorbire questo gas nei recipienti di cultura, dal momento che oggidì abbiamo a nostra disposizione una serie numerosa di altri mezzi, molto più semplici e più sicuri.

(1) Braatz, *Eine neue Vorrichtung zur Cultur von Anaëroben in hängenden Tropfen*, Centralblatt f. Bacteriologie Vol. 8. 1890, p. 520.

CAPITOLO V.

Trasmissibilità dei microrganismi patogeni. Innesti — Autopsie.

Fin qui si è parlato dei metodi che servono per dimostrare la presenza dei microparassiti nell'organismo animale e per coltivarli al di fuori di questo: ma quando siffatte ricerche sono state coronate da successo, e si sono trovati elementi parassitarî, che si ha fondamento di ritenere come caratteristici della malattia, rimane ancora la parte più difficile, e più decisiva d'altronde, per stabilire l'eziologia di un morbo infettivo, *la riproduzione*, cioè, *degli stessi fenomeni morbosi osservati spontaneamente, ottenuta introducendo artificialmente nell'organismo animale sano i batterii coltivati allo stato di purezza dall'organismo ammalato.*

Per quanto sia questo l' *experimentum crucis*, il quale serve a dimostrare che i batterî riscontrati in una data malattia, sono realmente la causa di essa, aggiungo però subito che non conviene neppure esagerarne il valore. E difatti da un lato l'esperimento negli animali, se positivo, non può avere il valore di prova indiscutibile, se non allorquando è fatto su animali della stessa specie e nelle stesse condizioni in cui si è prodotta spontaneamente la malattia, condizioni che riflettono l'età, il sesso, la via d'introduzione, ecc.; il che è assai difficile ad ottenere, specialmente per le malattie dell'uomo, di cui noi precisamente ci occupiamo, per le quali si è quasi sempre costretti a scegliere per le esperienze piccoli animali, assai lontani e diversi da noi. Da un altro lato poi, pur riescendo negativa la prova d'innesto negli animali, ciò non può servire, per gli stessi motivi, ad annullare l'importanza patogenica dei microrganismi inoculati, ben sapendo quanto sia diversa la recettività per un dato virus, non solo nelle diverse specie, ma anche nelle diverse varietà e nei diversi individui di una stessa specie animale, e come diverso inoltre sia l'effetto, a seconda della via d'introduzione dei batterî nell'organismo.

Aggiungasi a ciò un altro fatto, posto in chiaro col progredire degli studî batteriologici, il quale può avere un gran peso sui risultati delle esperienze negli animali, ed è che certe infezioni non sono prodotte da un'unica, ma da parecchie specie di microrganismi associati insieme (infezioni miste), e che, oltre a ciò, in certi casi lo sviluppo dei microparassiti nell'organismo animale viene favorito dall'azione nociva che esercitano sui tessuti i prodotti dello scambio materiale di altre specie batteriche, che non sono parassitarie.

Quindi è che le modalità dell'esperienza dovranno variare, secondo i casi, anche a riguardo del materiale d'innesto; così, se in molti casi basta inoculare il prodotto della cultura pura di un dato microrganismo, conviene invece talvolta studiare anche l'azione di più microbi uniti insieme, e tener conto eziandio dell'azione predisponente, locale o generale, che possono esercitare nell'organismo i prodotti dei batterî semplicemente saprofiti.

Da ciò si vede come sia difficile realizzare coll'esperimento negli animali le stesse condizioni che si verificano nella malattia insorta spontaneamente, e come, per non essere tacciati di unilateralità, convenga ammettere che, per istudiare completamente l'eziologia di un morbo infettivo, spesso non bastano i soli dati batteriologici, relativi alla presenza dei microparassiti nell'organismo infetto, alle loro proprietà morfologiche, chimiche e fisiologiche, e all'esperienza negli animali, e che molta luce si può avere ancora dai risultati dell'osservazione clinica ed epidemiologica della malattia.

Per ovviare adunque, più che si può, alle difficoltà che si incontrano, allorquando si tenta di riprodurre ad arte l'infezione, mediante l'innesto negli animali dei batteri coltivati, la regola generale da seguirsi non può essere che questa: *che l'esperimento si faccia nelle condizioni più prossime a quelle naturali*, sia per riguardo alla scelta degli animali, come per la scelta della via d'introduzione e per la qualità e quantità del materiale d'innesto; giacchè in certi casi gli effetti dipendono anche dal numero dei batterî introdotti.

Per ciò che riguarda la *scelta degli animali*, ci incontriamo subito qui in una prima difficoltà: si dovrebbero infatti adoperare per l'esperienza individui appartenenti alla stessa specie ed alla stessa razza, a cui appartiene l'animale spontaneamente ammalato; ma quando si tratta di malattie dell'uomo, ciò non è permesso, per quanto talvolta si sia fatto l'esperimento nei condannati (lebbra), o sopra altri individui con virus non troppo pericolosi, come si è fatto per la febbre ricorrente, per la febbre malarica, per la gonorrea, per la risipola e pei microrganismi piogeni.

Qualche volta per ciò ne favorisce il caso; così è successo, ad es., per l'infezione colerica, che venne contratta da un medico nel laboratorio di Koch, mentre si esercitava praticamente nella diagnosi batteriologica del colèra.

Quando si tratta adunque di virus molto pericolosi, bisogna sempre ricorrere all'esperienza negli animali, e possibilmente in quelli di specie immediatamente affine. Anche questa condizione però è difficile a realizzarsi, giacchè la scimmia, che è l'animale più vicino all'uomo, è difficile ad aversi e costa assai. È per ciò che le esperienze si fanno invece comunemente su piccoli animali, i quali offrono una grande recettività per la maggior parte dei microrganismi patogeni, e che sono i conigli, le cavie, o porcellini d'India,

ed i topi. Di questi ultimi è specialmente la razza albina del topo di casa (*mus musculus*), che ha reso e rende i più grandi servigî per tali esperienze. Altri animali che si adoperano pure di frequente, per istudiare l'azione dei batterî patogeni, sono i polli, i colombi, e più raramente i cani, i quali si mostrano in generale poco sensibili all'azione dei virus infettanti.

Giova poi ricordare che le esperienze devono essere fatte contemporaneamente sopra un certo numero, e non sopra uno o due animali soltanto, giacchè bisogna tener conto anche della « disposizione individuale », la quale può essere diversa negli animali appartenenti ad una stessa specie, principalmente a seconda dell'età e del grado di robustezza.

Aggiungiamo infine che riesce sempre interressante per l'igiene il determinare l'azione dei batterî patogeni sul maggior numero possibile di specie animali, giacchè ciò serve per mettere in chiaro le possibilità di diffusione delle malattie infettive corrispondenti.

Relativamente alla *qualità* del materiale d'innesto, bisogna anzitutto tenere a mente il fatto dell'alterazione che possono subire i batterî, semplicemente per opera della vita saprofitica a cui sono costretti nei mezzi di cultura artificiali; per cui bisogna adoperare culture recenti e fatte nelle condizioni più prossime a quelle dello sviluppo parassitario. Anche l'*età* della cultura può avere influenza sul risultato dell'esperimento, per mezzo specialmente dei prodotti velenosi che formano i batterî nelle epoche diverse del loro sviluppo.

Per ciò che riguarda la *quantità* del materiale da introdursi nell'animale per riprodurre l'infezione, non è possibile dare alcuna regola precisa, giacchè varia assai a seconda della specie batterica, a seconda della specie animale su cui si fa l'esperienza, e finalmente anche a seconda della via per la quale i batterî vengono introdotti.

La *via d'innesto*, il che è quanto dire la porta d'ingresso pel materiale infettante, deve possibilmente essere la stessa di quella seguìta dall'agente patogeno in condizioni naturali. Ricordiamo a questo proposito quanto già si è detto riguardo alle vie naturali, per le quali possono i microparassiti penetrare nel nostro organismo, e che sono: la cute, l'apparecchio digerente, quello respiratorio e quello genito-urinario. Nelle esperienze negli animali a queste vie di introduzione se ne aggiungono anche altre, interessanti per scopi speciali, quali l'innesto endocranico, quello nella camera anteriore dell'occhio e nelle cavità sierose, e l'iniezione nell'albero vascolare sanguigno.

Abbiamo quindi altrettante forme d'innesto, delle quali descriveremo singolarmente le modalità di esecuzione.

1. Innesto cutaneo.

Con questo si applica il materiale infettivo sulla pelle privata dell' epidermide, senza che la lesione arrivi al tessuto sottocutaneo. È questo il caso in cui si ha *l'innesto* nel vero e proprio significato della parola, per quanto l'uso della stessa sia esteso a significare *l'introduzione di virus nell'organismo animale, fatta in qualsivoglia maniera.*

Questa specie d'innesto si pratica sulla pelle e sulla cornea. Nel primo caso si radono i peli, si lava bene con una soluzione di sublimato $1^0/_{00}$, e poscia con alcool, il punto in cui si vuol fare l'operazione, si fa con un coltello sterilizzato una piccola incisione superficiale, in modo da non oltrepassare lo spessore del derma e senza che sangue fuoriesca, e vi si applica il materiale che contiene i microrganismi. Si può anche fare in pari tempo l'incisione e l'applicazione del materiale, inquinando prima con questo il tagliente del coltello.

Per fare questo genere d'innesto il miglior sito nei conigli, ed anche nelle cavie, è la superficie interna dell'orecchio, vicino alla base. Si netta la cute nel modo suesposto, si praticano 2 o 3 ferite lineari, superficiali e parallele, e si inquinano colla sostanza infetta. Nei topi si riesce invece difficilmente a limitare la lesione alla cute soltanto.

Nella cornea si opera egualmente, esportando con un bistori una porzione di epitelio, ed applicandovi il materiale da innesto; se i microbi si sviluppano, se ne vedono le colonie penetrare nello spessore della cornea con figura di stella. Si può anche, ed è forse meglio, fare lo innesto pungendo la cornea con un ago da vaccinazione, bagnato nel materiale infettante.

È da osservare che l'innesto semplicemente cutaneo non offre una garanzia assoluta contro un possibile inquinamento con altri germi, rimanendo le lesioni di continuo a contatto dell'aria e sottoposte all'influenza degli agenti esterni. Oltre a ciò può l'innesto talvolta non riuscire per opera del sublimato, restando questo aderente alla pelle sotto forma di albuminato mercurico.

2. Innesto sottocutaneo.

Questa forma d'innesto è più comunemente usata, e si può fare in due maniere.

Si tagliano colle forbici i peli in una data regione, si pulisce colla soluzione di sublimato e coll'alcool, si solleva con un paio di pinze una piega della pelle, e si scava colla punta di un coltello una specie di saccoccia nel tessuto sottocutaneo, scollando per un certo tratto la cute dai tessuti sottostanti: in questa saccoccia si introduce il materiale infettante, preso colla punta del bistorì o coll'ago di platino sterilizzato. Nei topi si pratica quasi sempre l'innesto sottocutaneo, scavando la tasca sotto la cute del dorso alla radice della coda. Per praticare la saccoccia sottocutanea ed introdurvi entro il materiale, senza pericolo di toccare la pelle ed i peli vicini, serve bene un piccolo strumento, composto da due aste metalliche acuminate, divaricabili fra di loro a mo' di compasso: quando queste sono ravvicinate, costituiscono un ago, che sterilizzato sulla fiamma serve a perforare la cute ed a scollarla dai tessuti sottostanti, e quando poscia si divaricano, si può sulla guida delle stesse introdurre l'ansa di platino col materiale infettante.

Dopo avere introdotto il materiale, si asciuga la pelle con cotone o con carta sugante, e si ricopre la piccola ferita con uno strato di collodion.

La seconda maniera di praticare questo innesto è la *iniezione sottocutanea*, la quale ha sulla prima il vantaggio di escludere con maggiore sicurezza il pericolo di un inquinamento dall'esterno, giacchè la pelle, invece di essere incisa, viene soltanto perforata dall'ago della siringa.

Per fare le iniezioni sono stati proposti varî modelli di siringhe. Il più semplice è rappresentato dalla siringa Pravaz, in cui il pistone e le guarniture, invece che di cuoio, sono fatte di amianto, o meglio anche di midollo di sambuco (Straus). Queste sostanze hanno il vantaggio di permettere la sterilizzazione *in toto* della siringa col calore umido (corrente di vapor d'acqua, o bollitura) senza alterarsi. Un'altra utile modificazione di tali siringhe consiste nell'avere esse l' estremità, dove si innesta l'ago, di vetro smerigliato anzichè di metallo.

Altri modelli di siringa, altrettanto buoni, per quanto meno semplici dei primi, sono quelli proposti da Koch e da Tursini, nei quali la parte che contiene il materiale è totalmente separata

da quella che serve a spingerlo nell'interno dei tessuti, e può q uindi venire sterilizzata con maggior sicurezza.

La *siringa di Koch* (fig. 36) consta di un cilindro di vetro, graduato a decimi di centimetro cubico, il quale si sterilizza a parte insieme cogli aghi, e che si adatta a smeriglio nell'armatura metallica di una palla di gomma, per mezzo della quale si inietta il liquido, facendo agire un rubinetto che apre e chiude la comunicazione della palla col cilindro di vetro.

Molto semplice ed ingegnosa è la *siringa di Tursini* (fig. 37), composta da un cilindro di vetro graduato, il quale ad un' estremità termina a punta per ricevere l' ago-cannula, e dall' altra è unito ad una piccola camera di vetro, munita di un foro laterale e riempita di cotone. Questa parte della siringa si mette comunicazione, mediante un tubo di gomma, con un schizzetto comune a stantuffo di cuoio, oppure con un'altra pompa qualsiasi. Si fa sterilizzare il corpo della siringa, unito all'ago, entro un tubo da saggio nella stufa ad aria calda, o nella corrente di vapor d'acqua, e quando si deve adoperare si unisce ad una pompa premente, come si è detto.

Mentre si riempie o si svuota la siringa, come anche quando si aspira un liquido da una cavità, si tiene chiuso col dito il foro laterale della camera di vetro, aprendolo subito dopo fatta l'aspirazione o la pressione collo stantuffo. In tal modo si ristabilisce all'istante l'equilibrio di pressione nel corpo della siringa, e si evita che bolle d'aria entrino nella siringa, oppure vengano cacciate fuori dopo il liquido, come succede facilmente colle siringhe ordinarie.

Fig. 36. Siringa di Koch.

Fig. 37. Siringa di Tursini.

Per fare l'iniezione, se il materiale è già liquido, si inietta tale quale, altrimenti lo si stempera o si diluisce nell'acqua semplice, o nella soluzione di cloruro sodico 0,75 %, sterilizzata.

Le stesse manualità descritte per l'innesto sottocutaneo servono

anche, quando sia del caso, per fare l'innesto (o iniezione) *intramuscolare*.

3. Innesto nelle cavità sierose.

Non v'ha nulla di speciale nella manualità di questo innesto, il quale si deve compiere colle stesse avvertenze indicate per l'iniezione sottocutanea. Si radono i peli nelle regioni laterali del torace (cavo pleurico), o in quella dell'addome (cavo peritoneale), si disinfetta la cute, e poscia colla siringa, previamente sterilizzata e riempita del materiale da iniettare, si caccia dentro le cavità sierose il quantitativo di liquido che si desidera. Per eseguire quest'operazione nel cavo peritoneale, basta semplicemente tenere disteso l'addome dell'animale, messo in posizione supina, ed infiggere dentro obliquamente l'ago della siringa, finchè si sente che cessa ogni resistenza; a questo punto si è sicuri di essere penetrati in cavità, senza aver leso l'intestino: si spinge allora con cautela l'ago un poco più addentro, parallelamente alle pareti dell'addome, e si inietta il liquido. Con tale precauzione si può fare a meno di adoperare un ago speciale, come hanno proposto per tali iniezioni Stevenson e Bruce (1).

Si può anche fare una piccola apertura nelle pareti addominali, introdurre direttamente nel cavo peritoneale il materiale coll'ago sterilizzato, o colle pinzette, e poscia ricucire, ricoprendo la ferita con collodion.

4. Innesto nella camera oculare anteriore.

È una maniera d'innesto che ha importanza speciale per lo studio della tubercolosi, sia per seguire lo sviluppo della malattia nell'iride (Cohnheim), e sia per ottenere la cultura pura del bacillo tubercolare (Baumgarten). Oltre a ciò l'innesto nell'occhio si pratica con vantaggio anche per la riproduzione della rabbia canina.

Per fare quest'innesto bisogna anzitutto fissare l'animale bocconi sull'apposito tavolino d'operazione, ed è anche bene anestesizzare previamente la congiuntiva oculare con una soluzione di cocaina (2 %). Si tengono divaricate le palpebre con un dilatatore, si afferra con un paio di pinzette una piega della congiuntiva e con un bistori sottile si pratica un'incisione di 2-3 mm. lungo il mar-

(1) Stevenson e Bruce. *Eine neue Methode, Flüssigkeiten in die Bauchhöhle der Versuchsthiere einzuspritzen*, Centrabl. f. Bacter. Vol. IX, 1891, pag. 689.

gine corneale, ritirando immediatamente fuori il bistorì per non ledere l'iride e il cristallino.

Se il materiale d'innesto è solido, lo si introduce mediante un paio di pinzette curve e sottili, e se si tratta di culture su mezzi solidi, si introduce il materiale collo stesso coltello col quale si è fatta l'incisione; se son liquidi, si iniettano con una siringa, introducendo attraverso il taglio corneale un ago-cannula ricurvo.

5. Innesto endocranico.

Questa via d'innesto è stata usata dapprima da Pasteur, per riprodurre sicuramente la rabbia negli animali, e per praticarla nel coniglio, o nella cavia, non si fa che incidere la pelle al di sopra del cranio nella linea mediana, raschiare il periostio ed esportare con un piccolo trapano speciale un disco d'osso, del diametro di 5-6 mm. Messa a nudo così la dura madre, la si perfora con un ago-cannula ricurvo ad angolo retto, e si inietta al di sotto di essa qualche goccia del materiale contenuto nella siringa. Si richiude la ferita cutanea con 1-2 punti di sutura, e si ricopre di collodion.

Questa operazione nel cane è un po' più complicata, giacchè, dopo fatta l'incisione cutanea nella linea mediana, bisogna fare scivolare la cute da un lato e distaccare il muscolo temporale, per applicare il trapano nella fossa temporale, dove l'osso è più sottile e dove non si ha pericolo di emorragia.

6. Iniezione intravenosa.

Si pone allo scoperto il vaso sanguigno, che per lo più è una delle vene giugulari, o la crurale, con tutte le cautele antisettiche, si fanno passare al di sotto della stessa due fili, distanti 2-3 cm. circa l'uno dall'altro, per fare le legature necessarie, e quindi s'introduce l'ago della siringa entro la vena, nello spazio situato fra i due fili; si lega il vaso attorno all'ago-cannula col filo situato verso la periferia, per impedire che fuoriesca il sangue, e si spinge dentro il liquido cautamente, a poco, a poco. Bisogna far bene attenzione a che il liquido non contenga alcuna bollicina d'aria, essendo noto che l'introduzione di questa nell'albero venoso può produrre la morte immediata dell'animale. Fatta l'iniezione, si chiude coll'altro filo l'estremità centrale del vaso, si ritira la cannula, si lega anche l'estremità periferica della vena e si cuce la ferita come d'ordinario.

L'operazione dell'introdurre l'ago nella vena e di chiudere col filo l'uscita del sangue dev'essere fatta colla massima sollecitudine, per prevenire possibilmente la coagulazione del liquido sanguigno, che viene a contatto dell'ago, e quindi la

chiusura del lume di questo. Per ovviare a tale inconveniente, che compromette spesso l'esito dell'operazione, val meglio introdurre prima l'ago-cannula, distaccato dal corpo della siringa, con entrovi il filo metallico che impedisce l'ingresso del sangue; fatta la prima legatura, si ritira il filo metallico, si innesta la siringa appena si vede il sangue venir fuori dall'estremità esterna della cannula, e si spinge dentro il liquido immediatamente.

L'iniezione intravenosa nelle cavie, che hanno le pareti dei vasi molto sottili, riesce spesso abbastanza difficile, e nei topi è quasi impossibile eseguirla, a causa del piccolo calibro delle vene.

Se si tratta di animali un po' grossi, non è necessario mettere a nudo la vena, ma basta renderla turgida mediante la compressione, per introdurre direttamente l'ago della siringa nel lume del vaso attraverso la cute, privata dei peli e sterilizzata, come al solito.

Ciò nel cane è facilissimo, e si può fare anche nel coniglio in una delle vene superficiali delle zampe posteriori o dell'orecchio. Di queste ultime si sceglie generalmente, perchè più grosso, il ramo venoso che scorre lungo il bordo posteriore dell'orecchio. Non è però sempre facile imboccare il lume della vena; ma se ciò non riesce, è facile accorgersene, giacchè iniettando il liquido si vede formarsi una prominenza attorno alla vena, dovuta al raccogliersi del liquido sotto la cute. In tal caso è inutile cercare ulteriormente di penetrare coll'ago nel lume del vaso, e val meglio cercare senz'altro un'altra vena.

Per fare la diluzione del materiale da iniettarsi nelle vene, val meglio adoperare, anzichè l'acqua distillata, la soluzione di cloruro sodico 0,75%, sterilizzata, specialmente se si deve introdurre una certa quantità di liquido, e ciò per evitare l'azione dissolvente dell'acqua sui globuli rossi.

Talvolta è necessario filtrare grossolanamente il liquido, per eliminare il pericolo dell'embolismo, e talvolta invece si inietta ad arte nelle vene il materiale infettante in una sospensione di particelle solide, per istudiarne gli effetti.

7. Infezione per la via degli organi digerenti.

Il mezzo di introdurre nell'organismo animale il materiale infettante, misto al cibo, per la via degli organi digerenti è forse uno di quelli che dev'essere messo in uso più di frequente, se si vuol rintracciare la via naturale che ha percorso il parassita per penetrare nel nostro organismo. Difatti l'apparecchio digerente è una delle parti interne del corpo che ha commercio più diretto col mondo esterno,

ed i cibi e le bevande possono servire da veicolo ai germi di molte malattie.

Questo modo di inoculazione artificiale dei virus infettanti va esteso nel senso, che venga esclusa nel farlo la possibilità di una lisione di continuo nel rivestimento epiteliale, che tappezza la superficie del canale digerente, altrimenti si avrebbe il caso di un semplice innesto intra- o sotto-mucoso, secondo la profondità della desione. Prima condizione adunque nell'eseguirlo si è di usare cibi di tal natura, che non possano produrre lesioni della mucosa: miglior mezzo per ciò si è di mescolare le culture dei microbi con sostanze liquide (acqua, brodo, latte), le quali vengono ingoiate senza previa masticazione. Trattandosi di piccoli animali (topi), si somministra loro l'alimento infetto dopo averli lasciati qualche tempo a digiuno; per gli animali grandi si può, come hanno fatto Koch, Gaffky e Löffler nelle loro esperienze sul virus carbonchioso, prendere un cubo di patata fresca, tagliarvi una fetta a mo' di coperchio, fare un incavo nel cubo e porvi dentro il materiale infettante, ricoprendolo coll'altro pezzo di patata. Il cubo di patata, così preparato, si spinge entro la bocca dell'animale fino alla radice nella lingua, in guisa che venga ingoiato senza masticazioni.

Nei conigli e nelle cavie si introduce nello stomaco il materiale infettante per mezzo di un catetere elastico, che si fa passare nell'esofago attraverso il foro di un dado di legno, che si incunea fra le arcate dentarie divaricate. Bisogna soltanto avere l'avvertenza di non spingere con forza il catetere, per impedire che questo penetri nelle vie respiratorie invece che nell'esofago.

Si può anche introdurre il materiale infettivo direttamente nel duodeno, come hanno fatto Nicati e Rietsch per riprodurre negli animali l'infezione colerosa, evitando così l'azione nociva che il succo gastrico acido esercita sui batterî non sporigeni. Per lo stesso scopo Koch ha invece neutralizzato il contenuto stomacale mediante l'introduzione di una soluzione di carbonato sodico, prima di introdurre nello stomaco i bacilli colerigeni.

Quando tali esperienze si fanno con batterî sporigeni, è necessario fare separatamente la prova colle forme vegetative semplice e con le spore, per vedere se vi ha differenza nell'un caso e nell'altro.

8. Infezione per le vie respiratorie.

Anche l'introdurre il virus per mezzo dell'inalazione è uno dei modi di esperimento che più si avvicina alle condizioni naturali, per certi casi di infezione. Disgraziatamente però i metodi che si usano per tale oggetto sono abbastanza complicati, e non offrono guarentigie sicure contro la possibilità che l'infezione avvenga anche per altra via.

L'introduzione del materiale infettante per le vie respiratorie si può fare in due maniere:

a) Si inietta il materiale nei bronchi, attraverso un'apertura praticata nella trachea; ma questo modo di procedere, oltre il pericolo di un'infezione della ferita tracheale, offre anche l'inconveniente di non corrispondere esattamente alle condizioni naturali. Spesso difatti il materiale introdotto in tal modo desta nel polmone un processo reattivo infiammatorio, che è poi di ostacolo al generalizzarsi dell'infezione.

b) Si fa respirare agli animali un'aria carica dei germi infettanti. La sospensione di questi nell'aria si può fare in due modi: o per mezzo della polverizzazione di liquidi infetti (acqua sterilizzata, o brodo, contenente in sospensione i microrganismi), o per mezzo di polveri secche a cui sono aderenti i germi che si vogliono fare inalare.

Quest'ultimo mezzo si può, naturalmente, impiegare soltanto per quei batterî i quali resistono al disseccamento: si usa per ciò la polvere di carbone, o meglio le spore di un fungo comune, che è la *vescia* (*Lycoperdon*), le quali sono specialmente adatte per tali esperienze, essendo molto sottili e leggerissime. Si impregnano le polveri colla sospensione acquosa dei batterî, si lasciano disseccare entro un essiccatore, e si cacciano con un soffietto nelle gabbie dove sono gli animali.

La tecnica dell'inalazione dei virus negli animali è stata perfezionata specialmente per opera di Buchner (1), il quale ha usato gabbie ed apparecchi speciali, che vennero da lui applicati per risolvere la questione della penetrazione dei germi attraverso la superficie intatta delle vie respiratorie. Per ovviare all'inconveniente principale della polverizzazione ordinaria dei liquidi, che, cioè, il liquido nebulizzato non è composto soltanto di finissime gocciolne, ma anche di goccie più grosse, le quali bagnano rapidamente tutto

(1) Buchner, *Untersuchungen über den Durchtritt von Infectionserregern durch die Lungenoberfläche*, Archiv für Hygiene. Vol. 8. 1888 p. 145.

quanto l'animale e fanno sì che questo possa anche deglutire una quantità non indifferente di materiale infettivo, lo stesso Buchner (1) ha ideato un apparecchio molto semplice, di cui riproduciamo qui dall'originale il disegno schematico (fig. 38).

Il liquido contenente i batterî (*a*) viene polverizzato entro un largo tubo da saggio, mediante il polverizzatore ivi contenuto, fatto agire con una doppia palla di gomma, e la nebbia sottile che se ne svolge, uscendo dal tubo (*b*), viene condotta direttamente nello spazio dove respira l'animale. In tal modo tutte le goccie un po' grosse rimangono nel tubo, dal quale escono soltanto le goccioline più sottili.

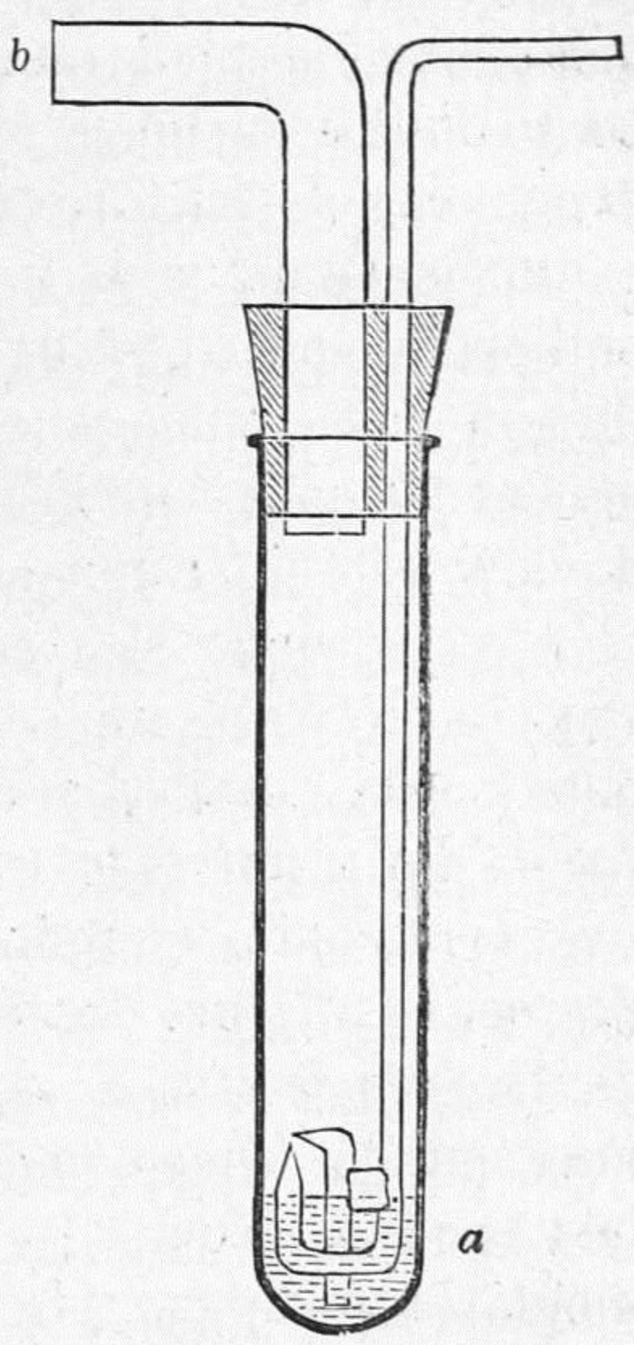


Fig. 38. — Polverizzatore di Buchner per l'inalazione dei liquidi infetti.

Secondo Buchner, polverizzando in tal guisa per mezz'ora entro uno spazio d'aria di 30-50 litri, dove è contenuta una cavia, una sospensione densa di spore carbonchiose, si produce in essa l'infezione, altrettanto sicuramente che coll'innesto sottocutaneo.

In tali esperienze è sempre preferibile lasciar libero l'animale, per non ostacolare in nessun modo la respirazione. Bisogna inoltre prendere le precauzioni necessarie perchè resti protetto chi fa l'esperienza: bisogna adoperare, cioè, pel polverizzatore tubi di gomma molto lunghi, e fare possibilmente l'esperienza all'aria libera.

9. Raccolta dei materiali patologici.

Allorquando si è constatato che coll'innesto del materiale puro di cultura dei batterî gli animali ammalano e muoiono, il compito dello sperimentatore non è ancora terminato. Occorre indagare le localizzazioni e la diffusione dei batterî inoculati, e le alterazioni patologiche da essi prodotte, per metterle in confronto con quelle osservate nei casi di malattia spontanea. Bisogna inoltre coltivare d, nuovo dall'interno dei tessuti dell'animale inoculato i microrganismii e colle culture che se ne ottengono, oppure direttamente col sangue e col succo degli organi, riprodurre in altri animali l'infezione, per

(1) Buchner, *Einfacher Zerstäubungsapparat zu Inalations-versuchen*, Centralbl. f. Bacteriologie Vol. 6, 1889, p. 274.

essere certi che si ha a che fare con una specie ben determinata di microparassiti, e che da essi realmente dipendono le alterazioni morbose e la morte degli animali inoculati.

Per raccogliere il materiale necessario per le culture e per gli innesti successivi, bisogna sezionare gli animali morti, facendo in modo che nessuna impurità si aggiunga dall'esterno a turbare il corso delle esperienze. Per ottenere ciò si deve badare principalmente a due cose. Anzitutto l'autopsia deve farsi appena dopo la morte; e ciò per evitare la moltiplicazione dei batterî patogeni nell'interno dell'organismo infetto, che dopo la morte è rapidissima, e per impedire in pari tempo che si mescolino a quelli i batterî della putrefazione: secondariamente poi bisogna adoperare, per sezionare il cadavere, istrumenti accuratamente sterilizzati.

A tal uopo si sterilizzano sulla fiamma, o nella stufa ad aria secca a 150° C., un certo numero di coltelli, forbici e pinze, ponendoli poscia sotto una campana di vetro, perchè si raffreddino al coperto dalla polvere.

L'animale, quando si tratta di coniglio o di cavia, si distende supino su di una tavoletta di legno, fissandolo su questa per le quattro estremità. Si comincia dal tagliare i peli lungo tutta la linea mediana del corpo, ove dev'essere fatta l'incisione della cute, e si lava poscia accuratamente colla soluzione di sublimato 1 ‰: si incide la pelle con un bistorì, oppure si taglia colle forbici sollevandola colle pinze, e si scolla dai due lati per avere un largo campo di operazione, privo della cute e delle impurità che vi sono aderenti. Nel proseguire la sezione, regola generale si è di *cambiare l'istrumento sterilizzato ad ogni nuova incisione che si deve fare.*

Questa precauzione è necessaria per evitare che germi estranei, restando aderenti al coltello nell'atto che si taglia la cute o gli strati superficiali, si mescolino poscia col materiale da coltivare. Dopo avere tagliato la cute, si arroventano adunque sulla fiamma le pinze, il bistorì e le forbici adoperate, e si pongono a raffreddare sotto la campana di vetro, prendendone altri già sterilizzati.

Si comincia dall'aprire la cavità del torace, praticando nella gabbia toracica una finestra sufficientemente ampia, perchè sia posto allo scoperto il cuore e la superficie dei polmoni; ed allora, se interessa di esaminare il contenuto pleurale, se ne prende una piccola quantità coll'ansa di platino sterilizzata, e se ne fanno preparati microscopici e culture, come ora si dirà. Si esamina poscia il polmone, tagliandolo e raccogliendone il succo colle solite avvertenze, per farne egualmente preparati e culture.

Per esaminare il sangue del cuore, si apre il pericardio, si

afferra la punta del cuore colle pinze e si apre l'orecchietta destra, raccogliendo il sangue immediatamente coll'ansa di platino. Si può anche, per maggior sicurezza, cauterizzare prima con una bacchetta di vetro arroventata la superficie dell'orecchietta, e poscia aprirla, oppure introdurvi direttamente l'ansa di platino o la punta di una pipetta, per raccoglierne il sangue.

Colle stesse regole si procede all'apertura della cavità dell'addome, e si fanno preparati microscopici col succo del fegato, della milza e del rene, preso colle cautele anzidescritte, esaminando anche il contenuto peritoneale, intestinale e quello della vescica, per osservare se accade la eliminaziane degli elementi parassitarî per mezzo dell'apparecchio uropoietico. Trattandosi di un organo molle, com'è la milza, si può anche estrarne il contenuto afferrandolo con due pinze sterilizzate e tirando fino a stracciarlo, per prendere poscia coll'ansa di platino il succo dall'interno, che non è stato così toccato da nessun istrumento.

Tanto col sangue del cuore come col succo dei diversi organi, ma specialmente con quello della milza, del fegato e del polmone, devono farsi culture, e non semplicemente per infissione nei tubi da saggio, ma sibbene *culture isolanti*, secondo il metodo già esposto delle diluzioni e delle culture piane, facendo tali culture colla gelatina e coll'agar, per vedere se nel materiale patologico si contiene una sola, o più specie di batterî.

Non ho bisogno di insistere ulteriormente sul modo di esaminare gli altri organi e tessuti dell'organismo: mi basti soltanto di aggiungere che non deve mai essere trascurato l'esame di nessuna parte, se si vuole acquistare una nozione esatta e completa del modo di distribuzione dei microparassiti nell'interno dell'organismo. In casi speciali, però, invece di eseguire l'autopsia coll'ordine sopradescritto, si rivolge specialmente l'attenzione sulla parte che più interessa.

Finalmente si prende un pezzo di ciascun viscere, e si fa indurire nell'alcool assoluto, per poterne fare sezioni e prepararle per l'esame coi metodi di colorazione più convenienti.

Trattandosi di piccoli animali, come sono i topi, per farne l'autopsia, si distendono in posizione supina sopra una tavoletta di sughero, coperta di parecchi strati di carta bibula, per raccogliere il sangue e gli altri liquidi patologici, e vi si fissano con forti spilli infitti nelle quattro zampe e nella testa. Si pulisce e si disseca la pelle dell'addome e del torace, si osservano le ghiandole linfatiche inguinali ed ascellari, e si escide colle forbici una porzione di gabbia toracica per mettere a nudo il cuore, evitando di aprire l'ad-

dome e di toccare le intestina. Si fa allora un'incisione nel cuore, oppure se ne strappa con un paio di pinzette sterilizzate la porzione ventricolare, e si raccoglie coll'ansa di platino il sangue fuoruscente. Del resto si procede come d'ordinario, avvolgendo in ultimo il topo nella carta bibula, per farlo bruciare.

Trova qui luogo adatto la raccomandazione, che i laboratorî batteriologici sieno provvisti di un piccolo forno per la cremazione degli animali infetti, per evitare il pericolo che essi servano come mezzo di diffusione dei germi patogeni, adoperati per le esperienze.

La sezione dei cadaveri umani si fa seguendo le stesse regole fondamentali, già esposte. In tal caso le operazioni batteriologiche sono generalmente più complicate, giacchè quasi sempre l'autopsia si pratica passate le 24 ore, allorquando, cioè, la putrefazione, specialmente nella stagione calda, è già abbastanza avanzata, perchè i relativi batterî sieno penetrati nell'interno dell'organismo. È per ciò che, specialmente pel materiale patologico che si ricava dai cadaveri umani, non si deve mai deviare dalla regola batteriologica già espressa, di praticare con esso fin da principio le culture isolanti, e non le culture semplici per infissione o per strisciamento. Il non aver rispettato questa norma fondamentale è stato causa di molti errori nelle ricerche batteriologiche, relative alle infezioni dell'uomo. Si deve inoltre per le culture adoperare sempre anche l'agar, perchè molti batterî patogeni non si sviluppano che sopra i 30° C.

Quando si tratta di trarre il materiale per le culture da organi, che furono estratti dal cadavere già da qualche tempo, si può, secondo le prescrizioni di Gaffky (1), dopo avere lavato il viscere colla soluzione di sublimato, fare una grande incisione longitudinale che comprenda la totalità del viscere stesso si fa poscia con un secondo coltello un'altra incisione in direzione perpendicolare sulla nuova snperficie di sezione, senza giungere però fino alla periferia, e finalmente se ne fa una terza nello stesso modo, per prendere da quest'ultima superficie di taglio il materiale per le osservazioni e per le culture.

Questo però si può fare soltanto quando l'organo ha una certa grandezza. In caso diverso è preferibile tenere immerso il viscere in una soluzione di acido fenico al 5% per 5 minuti, tenerlo poscia per altrettanto tempo nella soluzione di sublimato all'1‰, e finalmente, dopo averlo bene asciugato con carta bibula, tagliarne

(1) Gaffky, *Zur Aetiologie des Abdominaltyphus*, Mitth. a. d. kais. Ges. Bl. II. p. 386.

dalla superficie verso l'interno una serie di sezioni, cambiando il coltello per ciascuna di queste, finchè si è giunti nel centro dell'organo, donde si prende il materiale coll'ansa di platino, oppure se ne stracciano via alcuni pezzi colle pinze arroventate, come già si è accennato.

Quando si deve estrarre un liquido da una cavità, si fa anzitutto la sterilizzazione chimica della superficie esterna, oppure la si cauterizza con un ferro rovente, o con una bacchetta di vetro fortemente riscaldata, e si penetra attraverso l'escara colla punta robusta di una pipetta sterilizzata, o coll'ago di una siringa, per aspirarne il liquido. Se la parete della cavità è molto spessa, si pratica attraverso l'escara un'incisione, e da questa si raccoglie il liquido coll'ansa di platino, o colla pipetta.

Quando si voglia conservare il materiale, o trasportarlo altrove per farne l'esame, lo si aspira entro tubi di vetro tirati alla lampada in punta sottile ad ambo le estremità, le quali si aprono nel momento della raccolta e poscia si saldano nuovamente. Nei tubi di vetro così preparati, e tenuti all'oscuro, la virulenza e la vitalità dei germi patogeni si conservano lungamente. — Per la conservazione dei virus serve bene anche la glicerina, come ha trovato Roux (1) pel virus rabbico, e come ha dimostrato Sclavo (2) anche pel diplococco di Fränkel, pel bacillo del colèra dei polli, e per quello del carbonchio, conservando nella glicerina la milza degli animali infetti. Quest'ultimo microrganismo però, secondo le osservazioni di Sclavo, subirebbe nella glicerina un certo grado di attenuazione.

(1) Annales de l'Institut Pasteur. Vol. I. pag 87.
(2) Rivista d'igiene e Sanità pubblica, Anno III, 1892, pag. 554.

CAPITOLO VI.

Esame dell'aria, dell'acqua e del terreno.

L'influenza che esercita l'ambiente in cui viviamo, ossia l'aria, l'acqua ed il terreno, sull'insorgere di certe malattie, specialmente sullo sviluppo di quelle infettive, non era sfuggita all'osservazione dei medici fino dai tempi più remoti; e di quest'influenza, indicata dapprima in modo vago e indeterminato, si era puranco tentato di rintracciare le cause nelle proprietà inerenti ai mezzi stessi in cui viviamo. Quindi, secondo le teorie che dominarono nelle varie epoche sulla natura dei morbi infettivi, e secondo la maggiore o minore importanza attribuita al contenuto di umidità e alla temperatura dell' aria, al contenuto di materiali organici ed inorganici dell'acqua ed alle emanazioni gazose del terreno, si erano prese specialmente in esame le proprietà fisiche e chimiche di questi mezzi

In seguito però si riconobbe che siffatte proprietà dell' aria, dell'acqua e del terreno non sono direttamente attive nel produrre le malattie, ma agiscono per via indiretta, esercitando un influsso su certi processi di decomposizione delle sostanze organiche; sicchè l'influenza loro, nociva per la salute del nostro organismo, è specialmente in relazione colla quantità e qualità dei prodotti delle stesse decomposizioni. Si studiarono perciò quali erano le condizioni favorevoli a quei processi e quali i loro prodotti, misurando il quantitativo di anidride carbonica nell'aria e il contenuto di sostanze organiche, ammoniaca, acido nitrico, ecc., nell'acqua. Si era fatto così un gran passo in avanti, e lo dimostrano invero i risultati importanti ottenuti da tali studî per opera di eminenti osservatori, a capo dei quali sta Pettenkofer.

Ma quando finalmente Schwann e Cagniard-Latour ebbero dimostrato che i processi di fermentazione e di putrefazione non dipendono soltanto dalla presenza dell'ossigeno dell'aria atmosferica, ma che è necessario eziandio per la produzione di essi l'intervento di elementi organizzati, i quali moltiplicandosi dànno luogo a decomposizioni speciali del mezzo in cui vivono, e quando fu più tardi stabilita sopra solide basi la dottrina del « contagio vivente » per l'origine di certe malattie, allora di necessità l'attenzione fu rivolta, oltrechè ai prodotti della decomposizione, anche e specialmente agli elementi produttori, ossia ai microrganismi.

Ed infatti oggidì, per poter giudicare delle proprietà nocive dell'aria, dell'acqua e del terreno, è necessario ricercare e studiare, a lato delle proprietà fisiche e chimiche di questi mezzi, anche il contenuto di germi organizzati, che vi esistono in svariate circostanze.

1. Esame batteriologico dell' aria.

Le prime ricerche, relative alla qualità e alla quantità dei germi che si contengono nell'aria atmosferica, sono strettamente connesse collo studio della questione della generazione spontanea; ed il metodo primitivo, applicato alla statistica micrografica dell'aria, consiste nella filtrazione dell'aria stessa attraverso il cotone solubile (fulmicotone), il quale veniva sciolto nell'etere ed esaminato direttamente al microscopio (Pasteur).

In seguito però le ricerche sui germi dell'aria si sono moltiplicate attivamente, essendosi attribuita all'aria una grande importanza come veicolo degli agenti produttori delle malattie infettive. E difatti, partendo dai semplici aeroscopî di Pouchet (1853) e di Miquel (1879), i quali, raccogliendo i costituenti solidi dell' aria in una goccia di glicerina, semplice o contenente glucosio, servono semplicemente a darci un'idea, mediante l'osservazione microscopica diretta della glicerina, delle polveri organiche e inorganiche (fibrille di lana e di cotone granuli d'amido, peli, cristalli salini, sabbia, carbone, ecc.) e tutt'al più anche delle spore di muffe nell'aria contenute, la tecnica dell'esame microscopico e batteriologico dell'aria si è arricchita, specialmente negli ultimi tempi, di un numero considerevole di metodi e di apparecchi, per mezzo dei quali siamo ora in grado di conoscere facilmente il numero, e fino ad un certo punto, anche la qualità dei batterî che l'aria contiene.

Pur troppo siffatti stud ìnon sono stati finora coronati da risultati molto brillanti, specialmente per ciò che riguarda la diffusione nell' aria dei germi patogeni, che è il punto più interressante per l'igiene; ma tuttavia essi hanno servito, per lo meno, a correggere alcune opinioni erronee che vigevano per lo addietro, e principalmente quella che ammetteva nell'aria l'esistenza di una grandissima quantità di germi viventi. Ora invece è dimostrato che in essa il numero dei germi, per quanto possa variare abbastanza, secondo le diverse condizioni di luogo e di tempo, pur tuttavia rimane sempre assai limitato.

I metodi di cui ci serviamo ora per l'analisi batteriologica dell'aria sono tutti basati sul principio unico dello sviluppo dei germi

sotto forma di colonie; questo scopo però può essere raggiunto per vie diverse, e cioè:

a) facendo semplicemente depositare i germi dell'aria sulla superficie delle sostanze solide di nutrizione.

b) facendo gorgogliare l'aria attraverso i mezzi di cultura liquidi, o attraverso i mezzi solidi fluidificati col calore (gelatina od agar).

c) filtrando l'aria attraverso polveri inerti, solubili od insolubili.

Il primo metodo, di lasciar depositare i germi sulla superficie dei mezzi solidi di nutrizione, fu la prima volta applicato da Koch, e fu anzi, dall'aver visto che le patate, cotte e dimezzate, lasciate qualche tempo esposte all'aria e messe poscia nelle campane di vetro, si coprono in seguito di una serie di punticini, i quali rappresentano altrettante colonie dei germi depostivi dall'aria, che ebbe l'idea di applicare i mezzi solidi di nutrizione, come metodo generale per la coltivazione dei batterî.

Tanto le patate, preparate come si è detto, come una lastrina di vetro, oppure una scatola di Petri, con suvvi uno strato di gelatina solidificata, lasciate all'aria per qualche minuto e tenute poscia coperte finchè si è verificato lo sviluppo dei germi, servono per darci un'idea approssimativa della qualità dei microrganismi contenuti nell'aria dell'ambiente dove furono esposti.

Naturalmente un tal metodo non può servire, quando si voglia conoscere in pari tempo la quantità di quei germi; e perciò lo stesso Koch (1) ha ideato un apparecchio semplicissimo, per mezzo del quale, valendosi dello stesso principio sopra esposto, si può arrivare anche a numerare, approssimativamente però, i germi dell'aria (Fig. 39). Quest'apparecchio è composto da un cilindro di vetro, alto 18 cm. e largo 6, nel fondo del quale si trova una scatola di vetro provvista di gelatina, che si può estrarre dal cilindro mediante una lastra d'ottone, su cui riposa la scatola stessa.

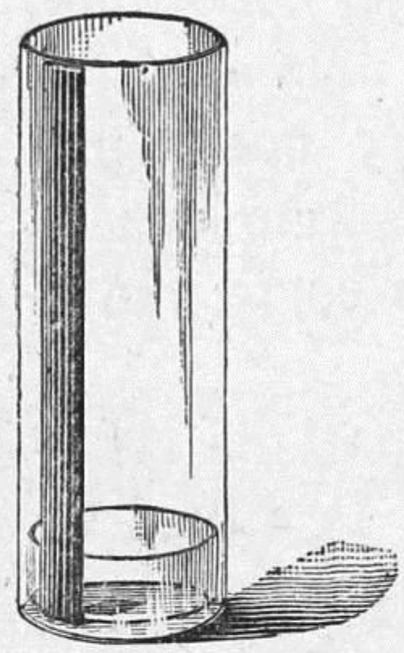


Fig. 39. — Cilindro di Koch per l'esame dell'aria.

Una serie di questi cilindri, provvisti di un tappo di cotone e sterilizzati, come di norma, si portano nel luogo di cui si vuole esaminare l'aria, si lasciano aperti per un dato tempo, e poscia si richiudono, per lasciare sviluppare i germi che l'aria avrà deposto sulla gelatina. In tal caso, ammet-

(1) Mittheilungen a. d. kais Gesundheitsamte Vol. I, 1881.

tendo che l'aria nel cilindro sia stata sempre in quiete durante l'esperienza, dal numero di colonie sviluppate nella gelatina si viene a conoscere quello dei germi contenuti nel volume d'aria del cilindro.

Non fa bisogno di spendere molte parole, per dimostrare che con un tal mezzo non è possibile giudicare esattamente del volume d'aria dal quale si sono depositati i germi sviluppati nella gelatina, e che per ciò i risultati che se ne ottengono non possono avere che un valore lontanamente approssimativo. Tuttavia questo metodo, comodo per la sua semplicità, può essere ancora applicato, quando si abbia di mira soltanto di fare esperienze di confronto approssimative fra l'aria di diversi ambienti, oppure nell'aria di uno stesso ambiente in diverse condizioni.

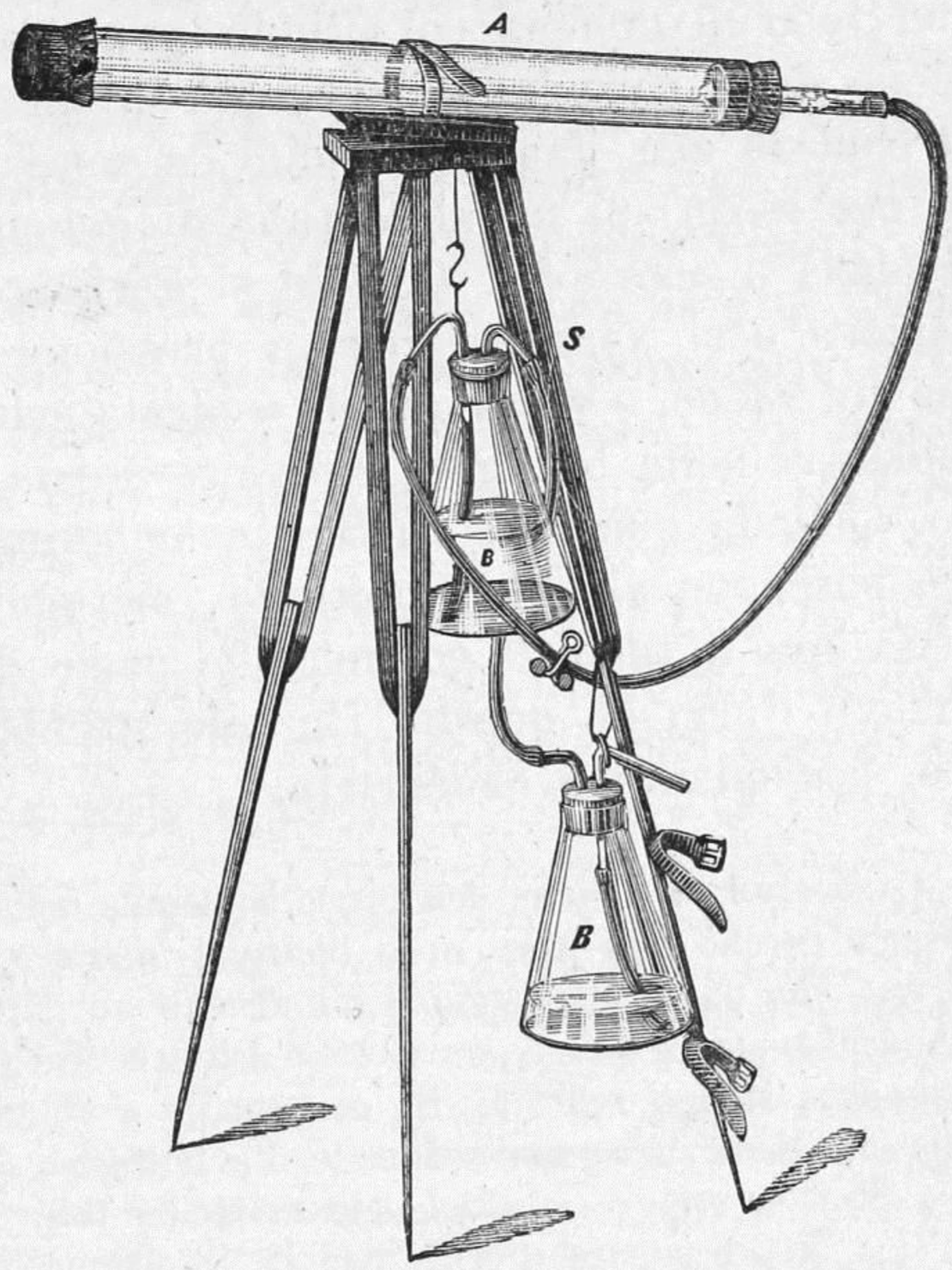


Fig. 40. — Apparecchio di Hesse per l'esame batteriologico dell'aria.

Basato sullo stesso principio, ma molto più esatto, è invece il metodo di Hesse (1), il quale ha cercato di fare in modo che una data quantità di aria atmosferica, strisciando lentamente sulla gelatina, vi depositi tutti i germi che contiene sospesi.

Egli si è servito perciò di un apparecchio speciale, che si trova disegnato nella fig. 40 e consta essenzialmente di due parti: *a*) del tubo di vetro contenente la gelatina, sostenuto da un alto treppiedi simile a quello usato dai fotografi; *b*) dell'aspiratore. Il tubo di vetro (A), lungo 70 cm. circa e largo 3,5 cm., di una capacità quindi di 670 cc. circa, è chiuso ad una delle sue estremità con due calotte di gomma elastica, una più interna avente nel centro un foro del diametro di 1 cm. ed un'altra esterna, sovrapposta alla prima e senza alcun foro. L'altro estremo del tubo è chiuso da un tappo di gomma, che ha nel mezzo un foro largo 1 cm.,

(1) Hesse, *Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen*, Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. II, 1884, p. 182.

destinato a ricevere un piccolo tubo di vetro lungo 10 cm. circa e largo 1 cm.

Questo tubo è chiuso da ambo le parti da due turaccioli di cotone, dei quali quello situato all'estremità che sta dentro il tubo maggiore sporge alquanto entro il lume di questo. Questi turaccioli di cotone servono da filtro per l'aria che è stata aspirata attraverso il cilindro.

L'apparecchio di aspirazione, posto in comunicazione per mezzo di un tubo di gomma col cilindro principale, consta di due bottiglie coniche della capacità di poco più di un litro, che stanno appese al treppiede con appositi uncini, e sono in comunicazione fra di loro per mezzo di un altro tubo di gomma, che porta nel mezzo una pinza a pressione. Quando si è riempita di acqua la bottiglia superiore e si apre la pinza a pressione, l'apparecchio funziona come un sifone, e viene quindi aspirata aria dal cilindro contenente la gelatina nella bottiglia superiore stessa, che si svuota a poco a poco. Quando questa è vuotata completamente, non si ha che cambiare posizione alle due bottiglie, mettendo sopra quella piena e adattandovi il tubo di gomma che parte dal cilindro, per aspirare di nuovo l'aria da questo. Un tale scambio si può ripetere tante volte, per quanto è necessario.

Conoscendo il volume dell'acqua contenuta nella bottiglia superiore e il tempo necessario perchè essa passi nella bottiglia inferiore, si viene a conoscere la quantità d'aria che passa attraverso il cilindro in un dato tempo. La rapidità del passaggio dell'acqua, e quindi la velocità dell'aria che passa a contatto della gelatina nel cilindro, si può regolare in due modi: o chiudendo più o meno il tubo di gomma che tiene in comunicazione le due bottiglie, mediante una pinza a pressione munita di vite, oppure introducendo in quello tubi di vetro di vario calibro, pei quali si è in precedenza determinato il tempo che impiega un litro d'acqua a passare attraverso di essi.

Il cilindro di vetro, che deve contenere la gelatina, si sterilizza, munito del tappo e delle calotte, nella corrente di vapor d'acqua, e vi si versano poscia, togliendo il tappo di gomma, 50 cc. di gelatina liquefatta. Fatto ciò, si rimette a posto il tappo e si porta il cilindro sotto un getto di acqua fredda, imprimendogli di continuo un movimento di va e vieni nel senso orizzontale e girandolo attorno all'asse longitudinale, fino a che la massa gelatinosa è giunta a consistenza semisolida: a questo punto si porta fuori del getto d'acqua e si continuano solamente i movimenti orizzontali, in guisa che la gelatina si depositi in maggior copia nella parte inferiore del tubo, restando però in pari tempo tutto il resto della superficie interna di esso coperto da uno strato sottile dello stesso materiale.

Una volta fissato con una cinghia il cilindro sopra il treppiedi e posto in comunicazione coll'apparecchio aspiratore, non si ha che togliere colle dita bagnate nella soluzione di sublimato 1‰ la calotta di gomma esterna, ed aprire la pinza a pressione che chiude il tubo di gomma, per cui defluisce l'acqua dalla bottiglia superiore, e la ricerca incomincia. Per evitare che, se vi sono correnti di aria, queste portino dentro al tubo germi staccati dalla persona di chi fa l'esperienza, l'apertura del tubo stesso dovrà essere diretta contro la corrente e l'osservatore stare dietro l'apparecchio. La quantità determinata di aria, che si aspira attraverso il tubo orizzontale e che striscia sulla gelatina, deposita sulla superficie di questa tutti i germi che contiene; e se qualcuno ancor ne rimane, viene depositato sul batuffolo di cotone imbevuto di gelatina, che chiude il tubo alla sua estremità, e attraverso il quale deve passare l'aria per andare nell'aspiratore. Se nessuna colonia di microrganismi si sviluppa in questo batuffolo, ciò serve di controllo per stabilire che tutti quanti i germi dell'aria sono stati depositati sulla gelatina del cilindro.

Quando la ricerca è terminata, si applica di nuovo la calotta di gomma, immersa prima nella soluzione di sublimato, si lascia stare fermo il cilindro per qualche minuto, e si pone poscia nella medesima posizione in una stufa a 20-22° C., oppure si lascia alla temperatura dell'ambiente.

Hesse ha cercato con una serie numerosa di osservazioni di stabilire quali sono le disposizioni da darsi alle varie parti di questo apparecchio, perchè le esperienze riescano più esatte che si può. Ha studiato perciò l'influenza che esercita la velocità della corrente d'aria e la larghezza del foro d'ingresso, necessaria ad ottenere una data velocità, riuscendo a determinare certe particolarità del metodo, che sono necessarie a conoscersi, per ottenere risultati esatti e paragonabili fra di loro.

La condizione essenziale, a cui deve soddisfare la disposizione delle varie parti dell'apparecchio, è appunto quella che *tutti e quanti i germi, contenuti in una determinata quantità d'aria, vengano depositati sulla superficie della gelatina, divisi gli uni dagli altri*, in modo che le colonie che ne derivano si possano contare, osservare nelle loro particolarità di sviluppo e trasportare poscia singolarmente in altri mezzi di nutrizione, per istudiarne le proprietà biologiche principali. Per raggiungere tale scopo,

1.° L'apertura praticata nella calotta interna di gomma, da cui deve entrare l'aria, non dev'essere troppo larga, da far sì che la maggior parte dei germi si accumulino al principio del cilindro, stante la piccola velocità dell'aria che entra, e neppure eccessivamente stretta, in modo che la velocità dell'aria sia poi troppo intensa ed una parte dei germi si depositi anche sui contorni dell'apertura stessa. Per tubi lunghi 70 cm. la larghezza più conveniente dell'apertura d'ingresso dell'aria è di 1 cm.; in generale però dev'essere uguale a quella del tubo di uscita.

2.° La velocità dell'aria aspirata nel tubo dev'essere diversa a seconda del

contenuto in germi dell'aria stessa. Nelle ricerche fatte all'aperto, perchè tutti i germi sieno depositati sulla gelatina, basta far passare attraverso il cilindro 1 litro d'aria ogni 2-3 minuti, ed in quelle fatte in ispazî abitati 1 litro ogni 3-4 minuti. Possono fare eccezione a questa regola soltanto i casi in cui l'aria sia eccessivamente carica di germi; ed allora è necessario fare alcune ricerche preliminari, per determinare le singole condizioni favorevoli alla riuscita dell'osservazione.

3.° La quantità d'aria totale, che dev'essere aspirata in ciascuna ricerca, varia secondo il numero dei germi che vi sono contenuti. Dalle ricerche di Hesse risulta che all'aperto anche 100 litri d'aria non sono troppi, mentre nei luoghi chiusi e con molta polvere anche un mezzo litro può essere di troppo, poichè può depositare un numero tale di germi, da essere poi impossibile contarli. Nelle condizioni ordinarie per le ricerche all'aria libera bastano 10-20 litri, e per quelle in luoghi chiusi 1-5 litri.

Applicando tali norme, si trova anzitutto che i germi vengono tutti depositati sulla parte inferiore del tubo, per cui si vede che essi non sono così leggeri, come una volta si credeva, ed il numero delle colonie va a mano a mano diminuendo, a misura che sono situate più lontane dall'apertura d'ingresso; cosicchè la disposizione delle stesse assume la forma di un triangolo allungato, di cui la base corrisponde all'apertura del tubo e l'apice è rivolto verso l'aspiratore.

Il metodo di Hesse, per quanto segni un vero progresso nella tecnica dell'analisi batteriologica dell'aria, non è però scevro di inconvenienti, dei quali alcuni piuttosto gravi. Cominciamo col dire che l'apparecchio è abbastanza costoso, incomodo a trasportarsi e difficile da sterilizzare, in causa della lunghezza del cilindro; oltre a ciò, l'esame microscopico delle colonie e la loro pesca coll'ago di platino riesce assai difficile. Ma il difetto più grave sta in ciò, che non è possibile esaminare con questo apparecchio un volume considerevole di aria in breve tempo, giacchè la velocità massima con cui l'aria può passare nel tubo è di 3-4 litri per minuto; questo inoltre fa sì che, se vi ha un qualche errore nel metodo, esso viene moltiplicato notevolmente, allorquando i risultati dell'analisi vengono calcolati per un metro cubo di aria.

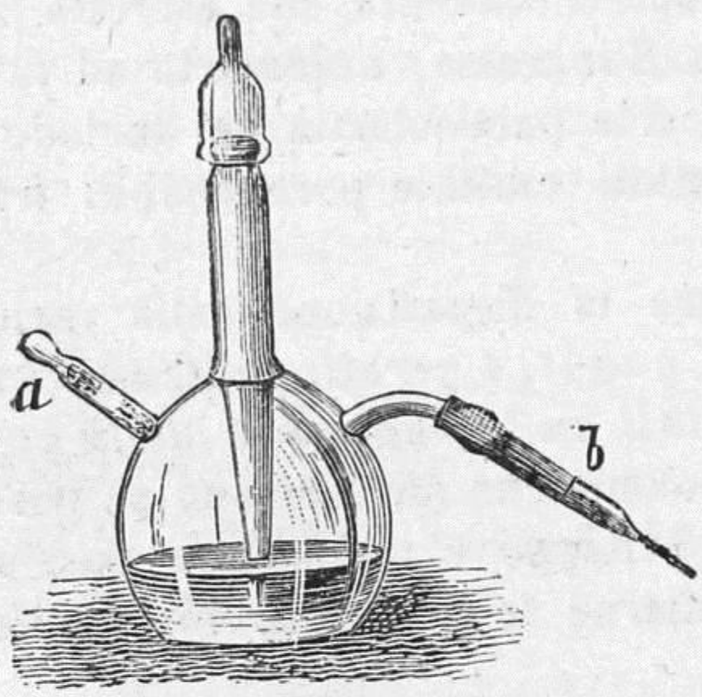


Fig. 41. — Pallone di Miquel per l'analisi batteriologica dell'aria.

I metodi che si propongono di analizzare il contenuto di germi dell'aria, facendola gorgogliare attraverso liquidi che li trattengono, sono di varia natura.

Incominciamo a descrivere fra questi il metodo di Miquel (1). Questi si serve di un pallone a fondo piatto (fig. 41), il cui collo, chiuso da un cappuccio di vetro smerigliato, termina in basso, fin quasi al fondo del recipiente, in un tubo a punta capillare, attraverso il quale

(1) Miquel. *Des procedés usités pour le dosage des bactèries atmosphèriques*, Annales de l'Institut Pasteur, 1888, p. 364.

passa l'aria durante l'esperienza. Il pallone è provvisto di due tubi laterali; uno di questi (*a*) porta nell'interno due tappi di cotone ed è destinato a stare in comunicazione con un apparecchio aspiratore; all'altro tubo (*b*), ricurvo, va unito per mezzo di un tubo di gomma un altro tubo di vetro a punta sottile, chiuso alla lampada. Dopo avere introdotto nel pallone 30-40 cc. d'acqua distillata, si sterilizza il tutto nell'autoclave, o nella corrente di vapor d'acqua. Per fare l'esperienza, si mette in comunicazione il tubo *a* coll'aspiratore, si toglie il cappuccio di vetro, e ci si allontana; l'aria gorgoglia attraverso l'acqua e si spoglia dei germi che contiene. Terminata l'aspirazione, si rimette a posto il cappuccio, e per mezzo del tubo di gomma, che si lascia unito al pallone in *a*, alternando il soffiamento coll' aspirazione, si spinge su e giù lungo il collo del pallone, per 10-12 volte, l'acqua in esso contenuta, per distaccare i germi che possono restare aderenti alla superficie del collo stesso.

Fatto ciò, si passa alla seminagione dei germi raccolti, la quale, secondo Miquel, può essere fatta nel brodo, o nella gelatina col metodo *misto*, già descritto a proposito delle culture isolanti. Nel primo caso si distribuisce il contenuto del pallone in 30-40 recipienti col brodo, e nell'altro invece entro scatole di Petri, oppure entro bottiglie coniche a fondo piatto, contenenti 10 cc. di gelatina nutritiva. L'operazione si termina introducendo nell'apparecchio, dopo che si è vuotato, 25 cc. di brodo, nel quale si caccia, mediante un filo di platino, il tappo di cotone interno del tubo *a*, tenendo poi questo recipiente in osservazione insieme cogli altri. — Secondo Miquel, dovrebbe sempre darsi la preferenza al brodo sulla gelatina, sia per la possibilità di mantenere le culture liquide ad una temperatura più favorevole per lo sviluppo dei germi dell'aria, e sia perchè il brodo è più adatto a richiamare in vita i germi dell'aria alterati dal disseccamento. La gelatina potrebbe adoperarsi soltanto a patto che ogni recipiente contenga, al massimo, 5-6 germi; giacchè molti di essi nella gelatina cominciano a germogliare soltanto dopo scorsi molti giorni (il 72 % dal 1° al 15° giorno, e il 28 % dal 15° al 30° giorno). Per nostro conto osserviamo invece che, adoperando come mezzo di cultura il brodo, non si può mai avere la certezza che l'intorbidamento sia dovuto allo sviluppo di un sol germe, anche quando, come prescrive Miquel, soltanto il 20-25 % dei brodi seminati presenti un qualche sviluppo. Volendo adunque adoperare un tal metodo, il quale esige del resto una serie di manipolazioni molto lunghe e delicate, è preferibile piuttosto applicare il metodo misto, tenendo in osservazione le culture pel tempo necessario a che si sviluppino i germi che la gelatina contiene.

Nel metodo di Miquel è stata introdotta qualche leggera variante per opera di Kiener e Aldiber (1), i quali non hanno fatto che modificare la forma del recipiente dove si fa gorgogliare l'aria, prescrivendo in pari tempo di lavarne accuratamente l'interno con acqua sterilizzata dopo averlo svuotato, per trascinare via i germi che vi possono restare aderenti.

Mentre nel processo ora descritto la raccolta e la seminagione dei germi costituiscono due momenti distinti dell'operazione, in altri processi congeneri lo stesso liquido, che serve a trattenere i germi dell'aria, serve anche per la loro coltivazione.

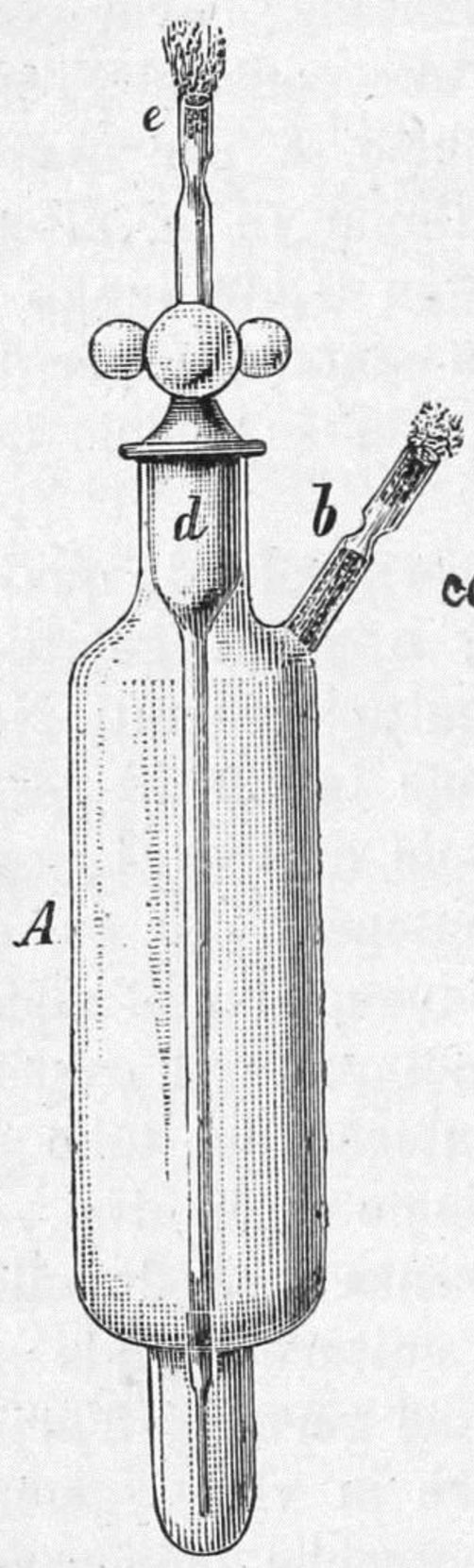


Fig. 42. — Apparecchio di Straus e Wurtz per l'analisi batteriologica dell'aria.

Un tal liquido è costituito dalla gelatina nutritiva, mantenuta fluida a temperatura conveniente.

Questo principio venne applicato dapprima da Hueppe (2) e da Kammerer e De Giacomi (3), e più tardi da Straus e Wurtz (4), i quali hanno proposto per ciò un piccolo apparecchio, rappresentato dalla fig. 42, che si compone di un cilindro di vetro A, nel quale si mette la gelatina, provvisto lateralmente di un piccolo tubo *b*, da cui si fa l'aspirazione. L'aria gorgoglia attraverso la gelatina, dopo essere passata pel tubo *e*, il quale chiude a smeriglio l'apertura superiore *d* del tubo A e termina quasi sul fondo di questo in punta sottile. Il tubo *b* è provvisto di due turaccioli di cotone, uno interno e l'altro esterno, separati fra loro da uno strozzamento del tubo, e l'apertura esterna del tubo *e* è chiusa egualmente da un turacciolo di cotone.

L'apparecchio, così composto, si sterilizza anzitutto nell'aria calda; vi si versano dentro 10-20 cc. di gelatina ed una goccia di olio sterilizzato, e si sterilizza poscia di bel nuovo nel vapor d'acqua. Per fare l'esperienza, si fa sciogliere la gelatina a moderato calore, avendo cura di tenere in mano, o meglio entro un bagno maria

(1) Kiener et Aldiber, *Sur les procédés de détermination quantitative des germes contenus dans l'air*, Revue d'hygiene, 1888 p. 768.

(2) Hueppe, *Die Methoden der Bacterien-Forschung*, 1886, p. 239.

(3) Kammerer u. De Giacomi, *Zur quantitativen Bestimmung der in der Luft enthaltenen Keime*, Archiv. f. experim. Path. u. Pharm Vol. 21, 1886, p. 318.

(4) Straus et Wurtz. *Sur un procédé perfectionné d'analyse bacteriologique de l'air*, Annales de l'Institut Pasteur, 1888, p. 171.

il recipiente durante l'operazione, per impedire che la gelatina si solidifichi; si mette in comunicazione con un tubo di gomma il tubo *b* coll'aspiratore, si toglie il turacciolo di cotone *e*, e si fa funzionare l'aspiratore colla velocità voluta, facendo gorgogliare attraverso la gelatina un certo numero di litri d'aria. L'olio che copre la gelatina impedisce che questa si sollevi in bolle grosse, e vada a raggiungere il tubo *b* durante il gorgogliamento dell'aria.

Terminata l'operazione, si rimette a posto il turacciolo *e*, si spinge, soffiando dal tubo *b*, la gelatina, per diverse volte, su per il tubo *e*, per distaccare i germi che l'aria vi ha deposto, si toglie il turacciolo esterno del tubo *b*, si spinge con un filo di platino entro la gelatina il turacciolo interno dello stesso tubo, si rimette a posto il turacciolo esterno, si rimescola, e finalmente si fa solidificare la gelatina nell'interno dell'apparecchio, alla Esmarch, oppure la si versa nelle scatole di Petri, diluendola, se occorre, con altra gelatina pura.

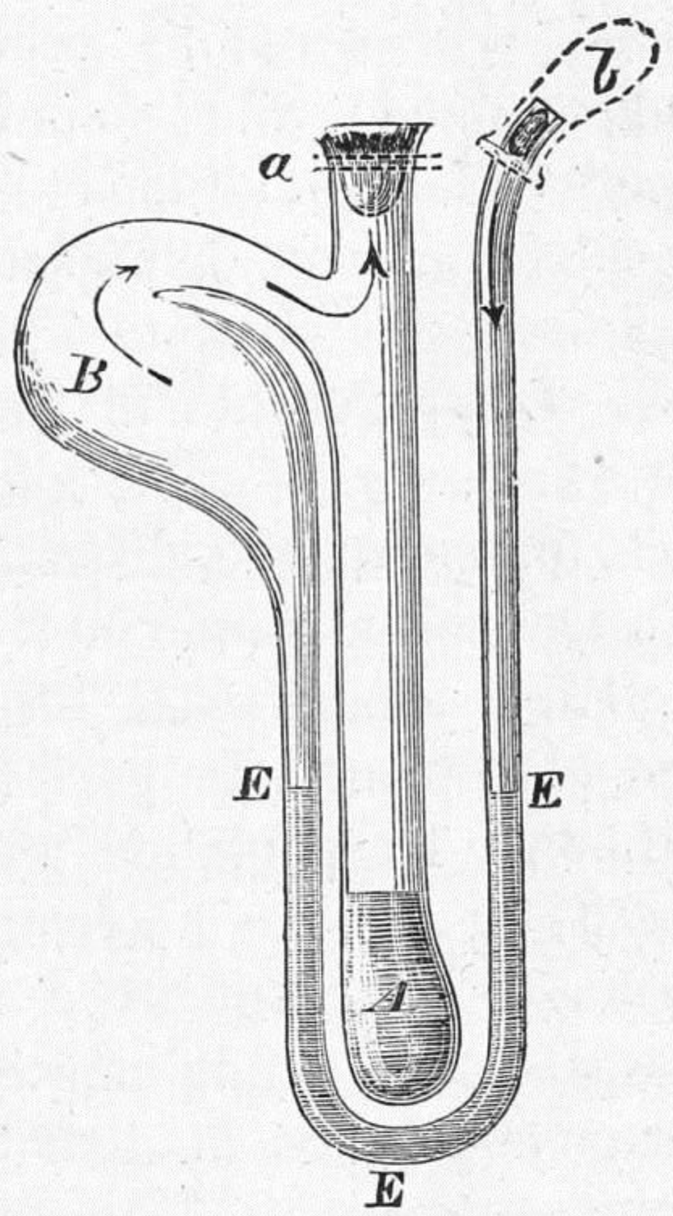


Fig. 43. — Microbiometro di Forstetter.

L'olio che si aggiunge alla gelatina, per lo scopo già detto, offre l'inconveniente che, emulsionandosi nella gelatina, allorquando questa si agita per distribuirvi i germi uniformemente, la rende alquanto opaca, ed ostacola così l'osservazione delle colonie che vi si sviluppano. Un altro inconveniente di questo metodo è quello che, mescolando il turacciolo di cotone colla gelatina, perchè non vadano perduti i germi che possono essersi in esso depositati, riesce difficile osservare e contare esattamente le colonie che si sviluppano fra i fili di cotone. È preferibile perciò, dopo aver versata la gelatina nelle scatole Petri, mettere nell'apparecchio altra gelatina pura, e cacciare in questa il tappo di cotone, mescolandola e facendola solidificare sulla superficie interna dell'apparecchio.

Un altro metodo congenere, che tiene il mezzo fra quello di Miquel e questo di Straus e Wurtz, è stato proposto da Forstetter (1), il quale si è servito di un piccolo apparecchio speciale, di vetro (fig. 43), composto essenzialmente da un tubo piegato ad U

(1) Forstetter. *Description d'un nouveau procedé d'analyse bacteriologique de l'air*, Annales de Micrographie N. 12, 1889, p. 567.

(E E E), a cui fa seguito un'ampolla (B), comunicante con un tubo da saggio (A), rigonfio al fondo per contenere una certa quantità di gelatina. Si versano nel tubo ad U 10 cc. di acqua distillata e nel tubo A 15 cc. di gelatina nutritiva al 12 %: si chiudono le aperture *a* e *b* con turaccioli di cotone e con calotte di gomma, e si sterilizza il tutto nel vapor d'acqua.

Giunto il momento di fare l'esperienza, si tolgono le due calotte di gomma e il cotone che chiude l'apertura *b*, si mette il tubo A in comunicazione coll'aspiratore, e si fa passare l'aria attraverso il tubo ad U ed all'acqua che vi si contiene; in tal guisa l'aria depone i suoi germi parte entro l'acqua e parte entro le pareti umide del tubo. Finita l'operazione, si chiude di nuovo col turacciolo di cotone l'apertura *b*, si fa liquefare la gelatina a moderato calore, e si inclina lo strumento in modo, che acqua e gelatina si mescolino insieme nell'ampolla B; fatto ciò, si piega lo strumento in senso opposto e si versa la gelatina entro le scatole Petri. In tal modo, addizionando alle colonie sviluppate nelle scatole il numero di quelle che si sviluppano nella gelatina che resta aderente alla superficie interna dell'apparecchio, si ha il numero totale dei germi contenuti in un dato volume di aria.

L'apparecchio di Forstetter offre non pochi vantaggi su quello di Straus e Wurtz, giacchè, mentre la raccolta dei germi costituisce un'operazione distinta da quella della loro seminagione, l'una e l'altra poi si fanno nel medesimo apparecchio, lungi dal contatto dell'aria atmosferica, escludendo così il pericolo dell'introduzione di germi estranei. In pari tempo con tale apparecchio, piccolo e facilmente trasportabile a distanza, resta escluso il pericolo, segnalato da Flügge, che i germi deposti dall'aria nella gelatina secondo, il processo di Straus e Wurtz, si moltiplichino in essa durante l'esperienza; e finalmente, mentre con quest'ultimo processo è necessario di fare la distribuzione della gelatina subito dopo la raccolta dei germi, l'apparecchio di Forstetter invece permette, dopo aver fatto la raccolta dei germi, di fare più tardi il restante dell'operazione.

Con tutto ciò i metodi migliori, che conosciamo finora per l'analisi batteriologica dell'aria, sono quelli fondati sul principio della *filtrazione dell'aria attraverso sostanze solide finamente porose, solubili od insolubili.* Colui che per primo applicò questo principio fu Pasteur (1), il quale, come si è detto, filtrava l'aria attraverso al fulmicotone, proponendo anche di utilizzare per tale esame i

(1) Pasteur, *Memoire sur les corpuscules organisés qui existent dans l'atmosphère*, Comptes rendus, 1863.

filtri solubili, composti di polvere di zucchero e di silicati alcalini; e solo più tardi Miquel e Moreau (1), e poscia Frankland (2) e Petri (3) hanno sperimentato per la filtrazione dell'aria diverse sostanze insolubili, quali l'amianto, la lana di vetro e la sabbia.

Secondo le esperienze di Petri, il materiale a cui si deve dar la preferenza è la sabbia sottile, disposta in un apparecchio ideato da lui (fig. 44), che si compone di un tubo di vetro lungo 10 cm. e largo 1,5-1,8 cm., nel quale si introducono due strati di sabbia di 3 cm. di lunghezza, tenuti in posto da cappucci di tela metallica sottile, appositamente preparati. La sabbia si prepara facendola passare dapprima attraverso un setaccio, le cui maglie non misurino più di $^1/_2$ mm. di larghezza, raccogliendo la sabbia che passa al di sotto e ponendola poscia in un secondo setaccio, avente le maglie di $^1/_4$ di mm.. La sabbia che non ha potuto passare attraverso il secondo setaccio si fa riscaldare fino al calor rosso entro un crogiuolo di ferro, rimescolandola con una bacchetta di vetro, e si ripone, ancor calda, entro tubi da saggio ch usi con ovatta. La sabbia, così preparata e sterilizzata, si adopera per preparare i filtri, come si è detto, in due strati distinti di 3 cm. ciascuno, per poterli poscia seminare separatamente e perchè l'uno serva di controllo all'altro. I tubi colla sabbia si chiudono con ovatta alle due estremità, si sterilizzano nell'aria calda a 150° C., e quando si vogliono adoperare, si sostituisce in essi uno dei turaccioli di cotone con un tappo di gomma, attraversato da un tubo di vetro, il quale si mette in comunicazione coll'apparecchio aspiratore: si toglie allora l'altro turacciolo di cotone, e si fa passare l'aria attraverso il filtro. La quantità d'aria totale e la velocità colla quale si fa passare devono variare, naturalmente, secondo la presunta ricchezza in germi dell'aria; secondo Petri, facendo passare 100 litri d'aria in 10-20 minuti, tutti i germi vengono arrestati dal primo filtro.

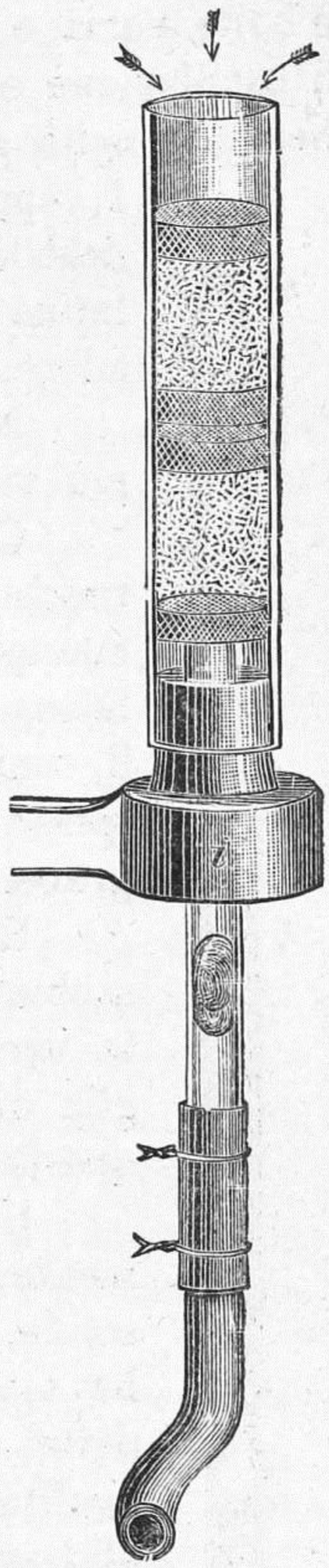


Fig. 44. — Filtro di Petri per l'aria.

(1) Miquel, Annuaire de l'Observatoire de Monsouris pour l'année 1880, 1885 et 1886.

(2) Frankland, *Methode der bacteriologischen Luftuntersuchungen*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. III, 1887, p. 287.

(3) Petri, *Eine neue Methode Bacterien und Pilzsporen in der Luft nachzuweisen und zu zählen*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. III, 1887, p. 1.

Finita l'operazione, si versa la sabbia del primo filtro in 3 o 4 scatole Petri, e quella del secondo in due scatole, e su ciascuna di esse si versano 10 cc. di gelatina liquefatta. Si aspetta che la sabbia sia completamente bagnata dalla gelatina e che sieno scomparse le bolle d'aria, e si imprime poscia alla scatola un leggero movimento di oscillazione su di un piano orizzontale, per distribuire uniformemente nella gelatina la sabbia ed i germi che vi sono aderenti.

I cappucci di rete metallica, che sostenevano la sabbia, debbono egualmente essere messi a contatto con altra gelatina, per coltivare i germi che vi possono restare aderenti.

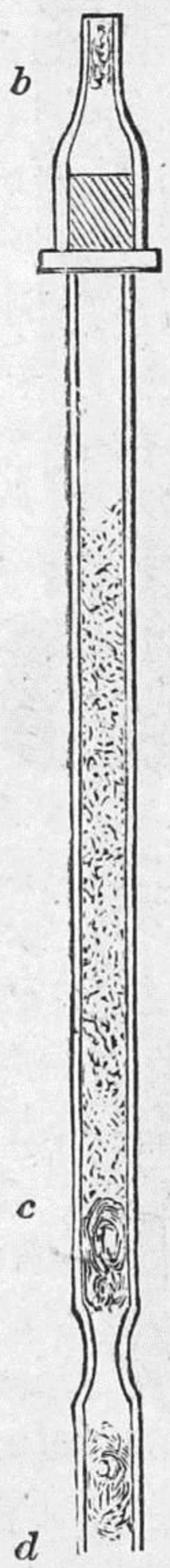


Fig. 45. Filtro solubile di Miquel.

Nelle esperienze ben condotte, la sabbia del filtro più vicino all'aspiratore non deve contenere alcun germe.

Come si vede, in questo metodo è complicato l'apparecchio, come anche la sua preparazione e il resto delle manipolazioni. Oltre a ciò, la sabbia mescolata colla gelatina ostacola non poco l'osservazione microscopica e il conteggio delle colonie che vi si sviluppano, giacchè spesso parecchie di esse si dispongono tutto attorno a un granello di sabbia.

È preferibile per ciò, quando si voglia adoperare la sabbia o un altro filtro insolubile, introdurre nel metodo la variante proposta da Uffelmann (1), il quale consiglia di lavare il filtro con acqua sterilizzata e fare con questa le operazioni di cultura dei germi raccolti.

Un tale inconveniente si può, anche più semplicemente, eliminare, adoperando per filtrare l'aria sostanze solide, *solubili*. È stato specialmente Miquel (2), che ha sottoposto ad uno studio accurato l'applicazione di dette sostanze per l'esame dell'aria, determinando le qualità che esse debbono avere, perchè rispondano bene allo scopo. Tali qualità consistono nell'essere anzitutto infusibili e inalterabili ad alta temperatura (150°-170° C.), nell'avere un debole potere antisettico e disinfettante, nell'essere nè deliquescenti, nè efflorescenti, e finalmente nell'essere solubili nell'acqua, molto e facilmente. Le sostanze che per siffatti requisiti possono chiamarsi migliori sono: *lo zucchero di canna* e il *solfato di soda anidro*, che era già stato proposto per lo stesso scopo da Galtier (3).

(1) Archiv f. Hygiene Vol. 8°, 1888, p. 262.
(2) Miquel, *De l'analyse microscopique de l'air au moyen des filtres solubles*, Annales de Micrographie T. I, 1889, p. 153.
(3) Revue scientifique, mai 1886.

L'apparecchio proposto da Miquel è semplicissimo (fig. 45).

Si compone di un tubo di vetro lungo 20 cm., largo da 5-6 mm., provvisto di uno strozzamento (*a*) e di un cappuccio di vetro smerigliato (*b*) uguale a quello dei palloncini Pasteur. In questo tubo si mettono due tappi di lana di vetro, in *c* e in *d*, e si sterilizza a 150° C.

La sostanza scelta (solfato di soda, o zucchero), ben disseccata, si polverizza in un mortaio e si passa attraverso due setacci, come si è detto per la sabbia, in modo da avere una polvere i cui granelli misurino $^1/_2$ mm. di diametro, circa. Uno o due grammi di questa polvere si versano entro l'apparecchio sopradescritto, togliendo il cappuccio di vetro e riscaldando il tubo leggermente, perchè le pareti sieno ben secche, in modo che la polvere formi nel tubo uno strato di 8-10 cm. di lunghezza. Si sterilizzano i tubi, così preparati, di nuovo a 150° C., e per metterli in azione si tiene il tubo in posizione verticale, imprimendogli piccole scosse, perchè la polvere si agglomeri bene sul tappo *c* e non lasci passar l'aria lungo le pareti del tubo.

Nelle esperienze ben condotte il tappo che sostiene la sostanza filtrante non deve, seminato nella gelatina, dar luogo allo sviluppo di alcuna colonia.

Si fissa il tubo in posizione verticale, o leggermente inclinata, col cappuccio rivolto verso il vento, si mette in comunicazione coll'aspiratore e si toglie il cappuccio di vetro, per lasciar passare l'aria. Il passaggio di essa attraverso il filtro si compie con una velocità e per un tempo diversi, secondo le circostanze: se si vuol conoscere la media giornaliera dei microbi per un dato luogo, si aspira l'aria lentamente per 12 o 24 ore, e se invece si vuol sapere il contenuto di germi dell'aria in un dato momento della giornata, si fa passare molta aria in poco tempo.

Finita l'aspirazione, si rimette a posto il cappuccio di vetro, e quando si vuol completare l'analisi, lo si toglie di nuovo e si versa la polvere in una quantità d'acqua variabile da 1 litro a 500, 100 o 50 cc., secondo la quantità di germi che si suppone esistano nel filtro, in modo che non si trovino più di 2 o 3 germi per ogni cc. d'acqua. Se la polvere non si distacca bene dal tubo, si toglie il turacciolo *c* (che si mescola colla gelatina in un tubo da saggio), e con una bacchetta di vetro sterilizzata si caccia la polvere fuori del tubo, il quale si lava infine con acqua sterilizzata.

Quando la polvere è completamente disciolta, si agita ancora l'acqua e si fanno con questa le culture frazionate nella gelatina, secondo il metodo *misto* di Miquel, introducendo 1 gr. di acqua contaminata in 24 bottiglie coniche a fondo piatto, contenente ciascuna 10 cc. di gelatina liquefatta. La gelatina comune può con

vantaggio essere sostituita in questo caso, come per l'analisi dell'acqua, dalla miscela di agar e gelatina, evitandosi l'inconveniente della liquefazione per opera dei batterî fondenti.

Con un calcolo semplicissimo, dal numero delle colonie sviluppate nei recipienti con gelatina, tenuti in osservazione per 15-30 giorni, si risale al numero di germi contenuti nell'acqua in cui si è sciolta la sostanza filtrante, e quindi a quello dell'aria filtrata.

Usando questo processo, si ha pure il vantaggio che soltanto una piccola parte della soluzione viene adibita per l'analisi quantitativa, e così il resto può benissimo adoperarsi per l'analisi qualitativa, e specialmente per la ricerca dei batterî anaerobi contenuti nell'aria, il che non è possibile fare cogli altri metodi. Notiamo infine che il solfato di soda, o lo zucchero, che si trova in tal guisa mescolato colla sostanza che serve per coltivare i microrganismi, anzichè ostacolare, favorisce il loro sviluppo.

Se a tutto ciò si aggiunge che l'ultimo apparecchio descritto per la filtrazione dell'aria è semplicissimo, poco voluminoso e quindi facilmente trasportabile, che si può mettere in azione dappertutto, e che dopo averlo provvisto di germi, si può conservare anche per qualche giorno prima di fare le culture, senza alcuno inconveniente, non esito a concludere che l'uso dei filtri solidi, e specialmente di quelli composti di sostanze solubili, è quello che offre i maggiori vantaggi su tutti gli altri finora proposti. Soltanto nel caso che si debbano fare le osservazioni all'aperto quando vi è nebbia, bisogna lasciar da parte un tal metodo, ed applicare invece gli apparecchi in cui si fa gorgogliare l'aria attraverso l'acqua, oppure attraverso la gelatina disciolta.

I dati ottenuti finora coi diversi metodi sopra esposti sul contenuto quantitativo e qualitativo dei germi dell'aria, se non corrispondono a ciò che se ne attendeva, come fu detto, non sono per ciò privi di interesse.

Nell'aria anzitutto si trovano commisti in diversa proporzione gli schizzomiceti, i saccaromiceti e gli ifomiceti. Questi ultimi si trovano per lo più isolati, mentre i batterî si trovano ordinariamente agglomerati attorno alle particelle di pulviscolo atmosferico. Questo fatto avea condotto in principio a ritenere, erroneamente, che i germi delle muffe fossero più leggeri di quelli dei batterî. Oltre a ciò, nell'aria prevalgono i micrococchi e le forme cromogene.

L'aria delle nostre abitazioni, in condizioni ordinarie, contiene in media da 3 a 6 germi per litro, e l'aria libera ne contiene press'a poco altrettanti. È naturale che il contenuto di germi dell'aria sia molto variabile, a seconda della quantità di pulviscolo in essa sospeso, e quindi a seconda dello stato di quiete o di movimento di essa, e secondo le altre condizioni atmosferiche (umidità, pioggia, ecc.).

Non esiste invece alcun rapporto fra il contenuto di CO^2 e il numero di germi dell'aria: questa può essere ricchissima di CO^2 e povera di germi, e viceversa. Questo dimostra come sieno insufficienti le ricerche sulla salubrità dell'aria, basate soltanto sulla determinazione del contenuto in CO^2.

Negli strati più bassi dell'atmosfera si contengono più germi che negli alti; l'aria delle alte montagne, come quella dell'alto mare, è la più povera in microrganismi.

L'aria fuoruscente dal terreno, se questo è umido e discretamente compatto, non contiene germi; cosicchè questi possono dal terreno esser portati nell'aria, soltanto nel caso si tratti di terra secca e non compatta, ed in ogni caso non possono provenire che da una piccola profondità. — I varî materiali di costruzione, anche se permeabili, non lasciano passare i batterî; soltanto le muffe passano qualche volta attraverso strati sottili dei medesimi.

Quanto ai batterî patogeni, finora nell' aria sono stati dimostrati soltanto i micrococchi piogeni e lo streptococco della risipola; altri però, come i bacilli della tubercolosi, del tetano e dell'edema maligno, si son trovati nella polvere, e questi naturalmente possono col pulviscolo essere sollevati nell'aria, quando essa è in movimento. Per ricercare in questa i germi patogeni, meglio che le culture, valgono gli esperimenti di innesto negli animali, fatti coll'acqua attraverso, la quale si è fatto gorgogliare un certo volume di aria.

2. Esame batteriologico dell'acqua.

L'esame batteriologico dell'acqua può avere scopi molto diversi, giacchè può, ad es., riuscire utile il conoscere la qualità dei germi che un'acqua contiene, allorquando questa dev' essere adoperata per certe industrie, come sarebbe per la fabbricazione della birra, o per la produzione di certe materie coloranti; ma dal nostro punto di vista lo scopo precipuo è quello di sapere se un'acqua può essere adoperata per bere, senza pericolo per la nostra salute.

A tale scopo interessa all'igienista di conoscere e la *quantità* e la *qualità* dei germi che l'acqua contiene. Perciò che riguarda la *qualità*, dico subito che la sua determinazione costituisce la parte più interessante della ricerca, giacchè tende a scoprire se vi sieno, o no, nell'acqua germi patogeni; ma essa è pur troppo in pari tempo la parte più difficile del còmpito, incontrandosi ostacoli di varia natura nell'eseguirla.

Per conoscere invece il numero di germi contenuti in un'acqua abbiamo diversi metodi, i quali non sono neppur essi esenti da errori, ma dànno tuttavia un' approssimazione tale, che si può dir sufficiente per lo scopo che vogliamo raggiungere. Che non si possa con un sol metodo di ricerca arrivare a scoprire tutti quanti i germi contenuti in un'acqua, facilmente si comprende allorquando si rifletta, che per conoscerli dobbiamo farli sviluppare sotto forma di colonie, e che le condizioni di sviluppo dei varî germi possono essere, come sono infatti, assai diverse. Noi sappiamo, ad es., che la temperatura più favorevole per lo sviluppo della maggior parte dei batterî acquatili è quella più comune degli ambienti (fra 15° e 20° C.); ma fra essi ve ne sono pure alcuni che si sviluppano a temperature vicine allo zero, oppure al di sopra dei 50° C., mentre

invece i germi patogeni prediligono generalmente una temperatura prossima a quella del nostro corpo.

Oltre a ciò, una notevole influenza sullo sviluppo dei germi dell'acqua viene pure esercitata dal grado di reazione alcalina del mezzo di nutrizione, come ha dimostrato Reinsch (1) con apposite ricerche, fatte sulla stessa acqua con gelatina a contenuto diverso di carbonato sodico. Secondo tali ricerche, la differenza fra il numero di germi sviluppati nella gelatina debolmente alcalina, quale si usa d'ordinario, e quella resa maggiormente alcalina, ben inteso fino ad un certo limite (circa 1 $^0/_{00}$), può essere fino di sei volte maggiore in quest'ultima che nella prima.

Si pensi inoltre che anche nell'acqua possono trovarsi microrganismi anaerobî, i quali vogliono essere coltivati con metodi speciali, e che finalmente è pure variabile la rapidità di sviluppo dei diversi microrganismi, anche aerobî, cosicchè è necessario tenere le culture in osservazione per un tempo piuttosto lungo, per essere certi che tutti i germi viventi hanno incominciato a germogliare.

Ora qualsiasi metodo non può da solo corrispondere a condizioni così svariate, e deve quindi riuscire più o meno inesatto, riguardo alla determinazione della quantità dei germi contenuti nell'acqua esaminata. Soltanto adoperando diversi metodi, contemporaneamente, si potrebbe riescire a correggere coll'uno gli errori dell'altro, ma ciò in pratica è difficile da eseguirsi pel lungo tempo necessario per ciascuno esame. Fortunatamente però, per giudicare della salubrità di un'acqua, è sufficiente di già quella certa approssimazione, che ci viene fornita dai metodi migliori che ora conosciamo, giacchè, come si è detto, non è tanto il numero, quanto la qualità dei germi, la quale ci illumina maggiormente nel nostro giudizio.

A proposito del metodo da ritenersi migliore per l'esame batteriologico quantitativo delle acque, è stata fervente la lotta fra la scuola tedesca, che sostiene l'uso della gelatina secondo il metodo di Koch per le culture isolanti, e la scuola francese, capitanata da Miquel, il quale ritiene migliore il metodo di cultura nei mezzi liquidi, o tutt'al più il metodo *misto*, di cui si è altre volte tenuto parola. A nostro avviso, tenuto anche conto dell'importanza non molto grande che ha per l'igiene il semplice conteggio dei germi dell'acqua, il metodo di Koch, con alcune avvertenze e modificazioni, può essere applicato e servire nella maggioranza dei casi; senza negare

(1) Reinsch, *Zur bacteriologischen Untersuchung des Trinkwassers*, Centralblatt f. Bacteriologie Vol. X, 1891, pag. 415.

però che il metodo misto di Miquel può dare risultati più esatti, specialmente quando si tratta di acqua molto ricca di microrganismi.

Qualunque sia il metodo che si adopera, per evitare errori, che potrebbero essere addirittura grossolani, è necessario usare certe avvertenze, sia nella maniera di raccogliere l'acqua per l'esame, come in quella di conservarla fino al momento in cui si pratica l'operazione.

L'acqua dev'essere raccolta entro recipienti sterilizzati, e in maniera tale che non vi si mescolino germi di altra provenienza. Per raccogliere l'acqua il mezzo migliore, per esattezza scientifica, è quello di adoperare tubi o palloni di vetro col collo tirato a punta sottile, saldato colla fiamma, il quale si rompe entro l'acqua: questa riempie allora parzialmente il recipiente, nel quale l'aria si trova rarefatta per opera della temperatura elevata, a cui fu riscaldato nell'atto di saldarne la punta, e dopo ciò si chiude nuovamente colla fiamma l'estremità sottile del recipiente. Questo mezzo ha però l'inconveniente della fragilità, e quindi della difficoltà di trasporto dei recipienti a punta sottile.

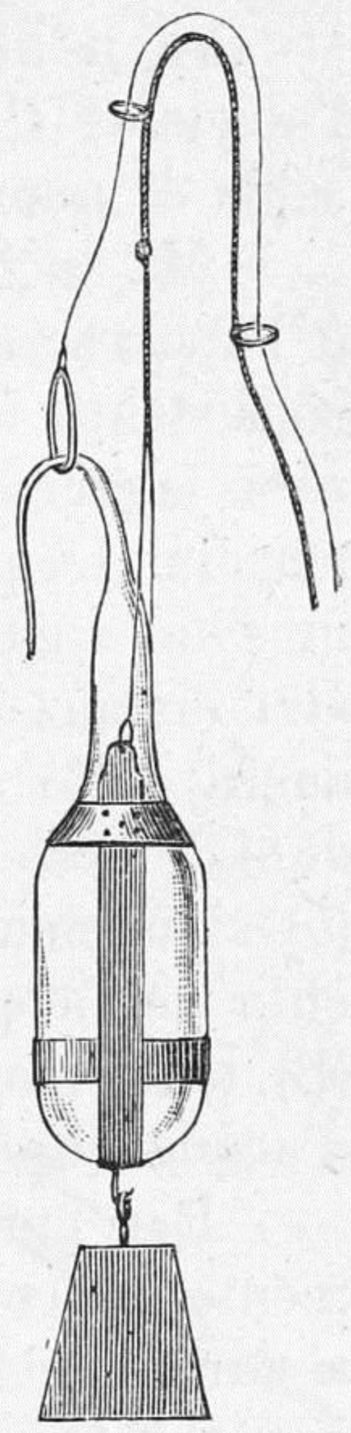


Fig. 46 — Apparecchio di Miquel pe la raccolta dell'acqua.

E perciò che val meglio adoperare, come Koch ha prescritto, le boccette d'Erlenmeyer chiuse con un tampone di ovatta, oppure, quando debba l'acqua essere per l'analisi trasportata a distanza, bottiglie di vetro della capacità di 100 a 200 cc., chiuse con un tappo di vetro smerigliato, o con un tappo di sovero (Miquel), ricoperto da carta o da una calotta di gomma, e sterilizzate in maniera conveniente.

L'acqua dev'esser raccolta in queste bottiglie, in modo da evitare qualsiasi contaminazione estranea; e quindi, se si tratta di acqua corrente, si immerge sott'acqua la bottiglia, appena tolto il tappo, coll'orificio diretto in senso inverso alla corrente, se l'acqua è stagnante, si immerge verticalmente, e se non è accessibile alla mano, si cala la bottiglia entro l'acqua, mediante una funicella ed un peso di piombo, o di ferro, attaccato al fondo della bottiglia.

Per attingere l'acqua a diverse profondità, sia in un fiume, come in un lago, o in un pozzo, o nel mare, si sono proposti di-

versi apparecchi. Uno dei più semplici è quello descritto da Miquel (1) (fig. 46), composto di un piccolo matraccio, capace di 50 cc., con estremità sottile, ripiegata in forma di collo di cigno, che si chiude alla lampada dopo avere fortemente riscaldato il matraccio sulla fiamma. Questo matraccio è contenuto in un'armatura di ferro, munita di un peso di 2 a 3 Kgr. di piombo, e sospesa ad una piccola corda resistente, graduata a metri e a frazioni di metro per mezzo di anelli e di nodi. Lungo questa corda scorre entro anelli, separati l'uno dall'altro dalla distanza di 1 metro, un filo di rame che termina in un anello, il quale abbraccia il collo del matraccio. Quando questo trovasi immerso alla profondità voluta, si tira il filo di rame, e così, rompendosi il collo del matraccio, l'acqua vi si precipita dentro. Una volta estratto il matraccio, se ne salda di nuovo il collo colla fiamma.

Ma anche più semplice, e più ingegnoso di quello ora descritto, è l'apparecchio proposto da Sclavo (2) per lo stesso scopo(fig. 47), consistente in una robusta provetta (A), lunga 25 cm. circa, e strozzata leggermente all'unione del suo quarto inferiore coi 3/4 superiori. La provetta è tirata da una parte in tubo sottile e piegata in *e* ad angolo retto; e il tubo sottile viene foggiato ad uncino, alla distanza di 10 cm. circa dalla prima piegatura. In corrispondenza dello strozzamento inferiore della provetta si pone un anello di fil di ferro (F), provvisto di altri due piccoli anelli, ad uno dei quali (*b*) si uncina la funicella (D) che serve per far scendere l'apparecchio nell'acqua, mentre all'altro anello si attacca un peso di piombo (B) tanto maggiore, quanto è più grande la profondità dello strato d'acqua che si vuole attingere.

Per mettere in azione l'apparecchio, si riscalda prima fortemente la provetta sulla fiamma e si chiude prontamente colla fiamma a dardo l'estremità del tubo sottile; si aggancia allora in *f* l'uncino con cui termina la provetta, si traccia con una lima una riga sul collo di questa (*d*) e si immerge l'apparecchio nell'acqua; giunto alla profondità voluta, si lascia scorrere sulla funicella un anello pesante di piombo (C), il quale battendo in *f* rompe il tubo nel punto *d*, intaccato dalla lima, e continua la sua discesa finchè si ferma sul nodo *c*. (3). A questo punto l'acqua si precipita nel tubo, e questo assume la posizione obbliqua rappresentata dall'altra figura. Nell'atto che l'apparecchio si innalza, l'acqua tende a fuoruscire da esso per la minore pressione a cui si trova soggetta negli strati su-

(1) Miquel. *Manuel pratique d'analyse bacteriologique des eaux*, Paris 1891.

(2) Sclavo, *Di un nuovo apparecchio per la presa dell'acqua a profondita*, Rivista d'igiene e Sanità pubblica N° 20, 1892

(3) Anche il peso di questo anello deve variare secondo la profondità a cui si attinge l'acqua.

perficiali, e non v'è quindi pericolo che l'acqua di questi strati si mescoli con quella raccolta alla profondità voluta.

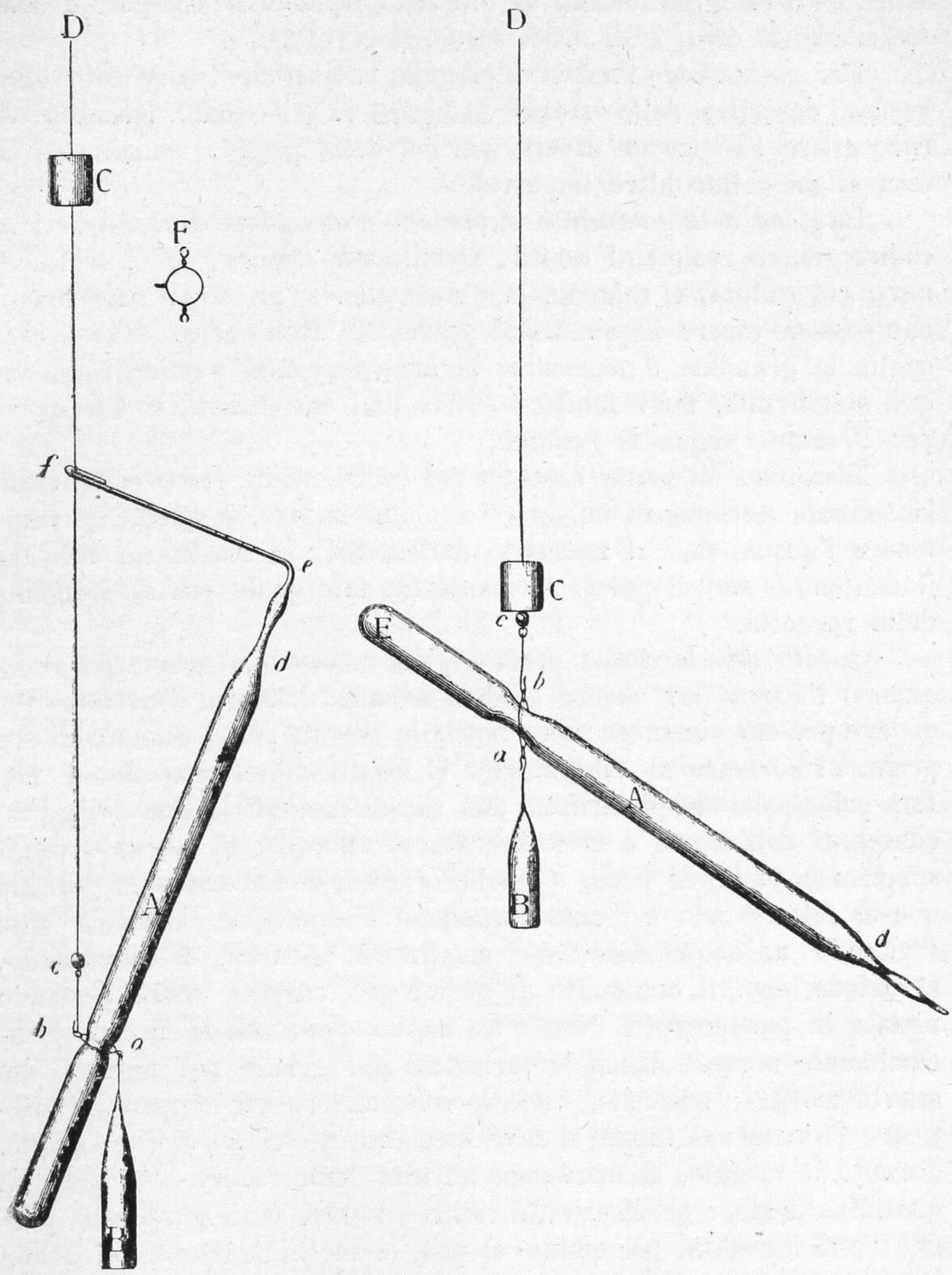


Fig. 47. — Apparecchio di Sclavo per la raccolta dell'acqua.

Estratto l'apparecchio, si asciuga esternamente con carta bibula, e se ne salda di nuovo con una fiamma l'estremità. Giunti in laboratorio, oppure arrivata la provetta a destinazione, se viene

spedita, si apre di nuovo l'estremità del recipiente, servendosi di una lima e di un carbone Berzelius, e si estrae l'acqua per l'esame. — Per impedire che la funicella si imbeva d'acqua, è bene spalmarla di cera, o di altra sostanza idrofuga.

Per raccogliere l'acqua di pioggia, può servire un piccolo *udometro*, descritto dello stesso Miquel (1), il quale permette di raccogliere l'acqua nei diversi periodi della pioggia, senza che ad essa si mescolino altre impurità.

Le *neve* e la *grandine* si possono raccogliere durante la loro caduta entro recipienti adatti, sterilizzati; oppure, se si tratta di neve già caduta, si tolgono, per raccoglierla, gli strati superficiali, che possono essere inquinati dal pulviscolo atmosferico, e se si raccoglie la grandine, è necessario lavarne dapprima i chicchi nell'acqua sterilizzata, farli fondere entro tubi sterilizzati, e adoperare per l'esame l'acqua di fusione.

Tornando all'acqua raccolta nei recipienti di vetro sterilizzati, la seconda avvertenza importante, a cui badare, è quella di mantenere l'acqua, fino al momento dell'analisi, in condizioni tali che il contenuto suo di germi si mantenga tale quale era al momento della raccolta.

Questo *desideratum*, però, è quasi impossibile ottenerlo, allorquando l'acqua dev' essere spedita ad una distanza considerevole, e deve per ciò rimanere nelle bottiglie per un certo numero di ore prima di arrivare al laboratorio. È difatti dimostrato che il fattore principale, che determina una rapida moltiplicazione dei germi contenuti nell'acqua, è la temperatura, allorquando questa diventa superiore, anche di poco, a quella originaria dell'acqua stessa. Ma questo fattore non è l'unico; giacchè l'esperienza dimostra che, togliendo un'acqua dalle sue condizioni naturali, di movimento, aerazione, ecc., il contenuto di germi può variare, anche restando uguale la temperatura. Non v'ha dubbio però che si devono principalmente a quest'ultima le variazioni più grandi nel numero dei microrganismi; cosicchè, tutte le volte che riesca impossibile praticare l'analisi sul luogo, si deve specialmente badare a che l'acqua, durante il viaggio, si mantenga ad una temperatura più bassa di quella naturale, e precisamente vicina allo zero (non più bassa), perchè resti impedita, per quanto si può, la moltiplicazione dei germi in essa esistenti.

A tal uopo si adoperano cassette speciali, costruite in modo, che la bottiglia o le bottiglie coll'acqua restino rinchiuse a sfre-

(1) Lavoro ultimo citato. pag. 7.

gamento entro un recipiente di zinco, il quale è contenuto in una cassetta di legno molto più grande, in cui si dispone, tutto attorno al recipiente di zinco, il ghiaccio rotto in pezzi e mescolato con segatura di legno, che ne ritarda la fusione. Questa seconda cassetta è a sua volta contenuta in una terza, e circondata da semplice segatura di legno. In tal modo la temperatura dell'acqua contenuta nel recipiente di zinco può mantenersi inferiore a +4.° C., finchè il ghiaccio che lo circonda non è fuso quasi completamente. Con tutto ciò non si è sicuri che il numero dei microrganismi rimanga invariato, sia per le ragioni anzidette, sia perchè, anche a temperature fra + 4° e 0° C., qualche germe può svilupparsi, e sia finalmente perchè a 0° qualche individuo batterico, poco resistente, può anche morire.

È per ciò che, quando interessa conoscere esattamente il quantitativo dei germi di un'acqua, è sempre preferibile farne l'analisi, appena dopo raccolta. Nè il far questo riesce molto difficile, allorquando si applichi il metodo di Koch colla gelatina distesa nelle scatole di vetro, giacchè può benissimo entro una cassetta portatile essere contenuto tutto quanto il materiale necessario per l'analisi.

Riguardo all'applicazione del metodo di Koch per l'esame dell'acqua, vi è poco da aggiungere a quanto è stato già esposto a proposito delle culture isolanti. Solo è a dirsi che la distribuzione della gelatina, nella quale si è mescolato un dato volume di acqua (1 cc. o frazione di cc.), è preferibile farla nelle scatole di Petri, le quali hanno tutti i requisiti per poterle adoperare anche per le analisi lungi dal laboratorio, senza avere l'inconveniente dei tubi alla Esmarch, specialmente riguardo alle forme fondenti, le quali sono appunto frequenti nelle acque. Ed invero le scatole di vetro tengono poco spazio, si possono facilmente trasportare fuori del laboratorio, pur mantenendole sterilizzate, e non hanno bisogno dell'apparecchio livellatore. Quando invece l'analisi si fa nel laboratorio, è preferibile, giusta la mia esperienza, versare la gelatina sulle lastre grandi di vetro, le quali offrono una superficie maggiore delle scatole Petri, e permettono meglio la separazione e lo sviluppo dei germi dell'acqua mescolati colla gelatina.

Un'altra avvertenza utile per queste ricerche è quella di usare, invece della gelatina semplice, la miscela nutritiva di agar e gelatina, la quale ha gli stessi vantaggi della prima, senza avere l'inconveniente della facile fusione per opera dei microrganismi che producono fermenti peptonizzanti.

Oltre a ciò, si baderà pure a che la gelatina abbia una reazione spiccatamente alcalina, giacchè questa, come si è detto, fa-

vorisce lo sviluppo dei germi dell'acqua. A questo proposito non possiamo per ora dire nulla di più preciso, non essendo ancora giustamente determinato il contenuto di alcali nella gelatina, più favorevole per lo sviluppo dei germi dell'acqua.

Le manualità del metodo d'analisi dell'acqua colla gelatina sono semplicissime. Si agita dapprima l'acqua nel recipiente, per avere in essa una distribuzione dei germi uniforme, per quanto si può, se ne prende con una pipetta sterilizzata, graduata a frazioni di cc., una certa quantità e si mescola colla gelatina liquefatta nei tubi, la quale poscia si versa nelle scatole o sulle lastre di vetro, colle avvertenze già note.

La quantità di acqua da mescolarsi colla gelatina varia a seconda della ricchezza in batterî, presunta nell'acqua. Se si tratta di acqua di sorgente, la quale presumibilmente contiene pochi germi, o nessuno, si può mescolare colla gelatina anche 1 cc. di acqua; se si tratta invece di altra acqua, che si suppone contenga un numero discreto di germi, si fanno parecchi saggi d'analisi, mescolando colla gelatina frazioni diverse di cc., ad es. $^1/_5$, $^1/_4$, $^1/_3$, $^1/_2$ cc., servendo così ciascun saggio di un certo controllo per gli altri, nel conteggio dei germi sviluppati in colonie. Appena però l'acqua contiene un certo numero di microrganismi, superiore ai 100 per cc., l'analisi fatta nella maniera anzidetta dà risultati poco attendibili, giacchè le forme fondenti impediscono di tenere le culture in osservazione tanto tempo, quanto si è detto essere necessario, perchè cominci lo sviluppo della maggior parte dei germi che l'acqua contiene, ossia almeno 10 giorni (1).

È preferibile allora, e si deve anzi far sempre quando si tratta di acqua molto impura (di fiume, di fogna, ecc.), diluirla precedentemente in un certo volume di acqua distillata e sterilizzata, che può variare dai 50, 100, 500, fino a 1000 cc. per ogni cc. d'acqua da esaminare. Fatta la diluzione e mescolata accuratamente, si prendono di essa frazioni diverse di cc., fino anche 1 cc., e si mescolano colla gelatina, come si è detto. È da raccomandarsi di fare per ciascun esame parecchi saggi contemporaneamente (10 a 20), per fare una media ed avere risultati meno inesatti che sia possibile.

Volendo applicare il metodo *misto* di Miquel, lo si fa colle stesse norme generali, già esposte a proposito dei metodi di cultura.

(1) Secondo le osservazioni di Miquel, nei primi 4 giorni non si sviluppa nella gelatina che il 38-40 % dei batterî viventi, contenuti nell'acqua che fu ad essa mescolata, e dopo 7 giorni il 75 %. Quindi, anche dopo una settimana, rimarrebbe ancora a svilupparsi un quarto circa dei germi che la gelatina contiene. Di questo fatto bisogna tener conto, allorquando si è costretti a fare molto presto il conteggio delle colonie, in causa dello sviluppo rapido delle forme fondenti.

Allorquando il numero di colonie sviluppate nella gelatina è considerevole, e riesce difficile il contarle, si adopera per tale oggetto un apparecchio speciale, così detto *conta-colonie,* il quale si compone essenzialmente di una lastra di vetro, divisa col diamante in piccoli quadrati, al di sotto della quale si trova un'altra lastra tinta in nero, destinata a far meglio risaltare le colonie sviluppate nella gelatina.

La scatola di Petri o la lastra di vetro colla gelatina si pone sopra il vetro quadrettato, e coll'aiuto di una lente si contano le colonie contenute in un certo numero di quadrati (6-8), se ne fa la media e si moltiplica questa pel numero dei quadrati corrispondenti alla superficie totale della gelatina.

Quando la gelatina sia distribuita nell'interno dei tubi da saggio, per contare le colonie havvi un piccolo apparecchio speciale (*conta-colonie* di Esmarch), per mezzo del quale la superficie del tubo viene sottoposta all'esame oculare, coll'aiuto di una lente semplice d'ingrandimento.

L'esame batteriologico *quantitativo* delle acque, se non può servire da solo a stabilire il grado della loro salubrità, serve però a risolvere altri problemi di grande importanza. Esso infatti serve anzitutto per giudicare del potere depurante, che hanno i filtri artificiali, o quello naturale del terreno, o gli altri mezzi proposti per privare le acque dei germi che contengono, mentre l'analisi chimica non può avere per ciò alcun valore.

Lo stesso esame serve anche bene per rivelarci la contaminazione, che nei corsi d'acqua ha luogo per opera dei rifiuti provenienti dalle città o dagli opificî industriali situati lungo le rive, come pure qualsiasi altra contaminazione accidentale, che può avvenire nelle acque adibite per l' uso alimentare e domestico.

L'altra parte, più importante, dell'esame batteriologico delle acque è quella che tende a determinare la *qualità* delle specie batteriche in esse contenute, e che costituisce pel batteriologo la parte del compito più laboriosa, più lunga e più difficile da eseguirsi come si dovrebbe. Dal punto di vista medico, bensì, dovendosi giudicare della salubrità, o meno, di un' acqua, si può per lo più rinunciare a fare un'analisi qualitativa completa, e limitare invece le ricerche alle specie patogene ed a quelle che accompagnano la putrefazione delle sostanze organiche d'origine animale; giacchè la presenza di queste ultime non è compatibile colla natura salubre di un'acqua da bere.

La ricerca dei batterî patogeni nelle acque è circondata da

una serie di difficoltà, di diversa natura. Anzitutto, se l'acqua contiene un gran numero di germi, riesce assai difficile, se non impossibile, rintracciare fra essi per mezzo delle culture gli esemplari patogeni che vi possono essere frammisti; tanto più che è soltanto una quantità di liquido, relativamente minima, che noi sottoponiamo alle nostre investigazioni. È per ciò che, quando si deve fare in un'acqua la ricerca di tali germi, giova spesso ricorrere al mezzo della *sedimentazione* del liquido, sia per mezzo dell'apparecchio proposto da Finkelnburg (1), e da lui già adoperato con successo per la ricerca del bacillo tifoso, e sia, anche meglio, adoperando la forza centrifuga, per radunare in un piccolo volume di liquido un maggior numero di microrganismi, come si è detto a proposito della ricerca dei bacilli tubercolari negli sputi, e di quella dei batterì patogeni, in generale, nei liquidi animali (orina, latte).

Con tutto ciò si riesce difficilmente a rintracciare nelle acque la presenza di microrganismi patogeni, sia colle culture, come coll'innesto diretto dell' acqua sospetta negli animali. Quest' ultimo mezzo spesso non riesce, perchè certi agenti specifici possono benissimo per mezzo dell'acqua propagare l'infezione nell'uomo (bacilli del tifo e del coléra), e non essere capaci di produrre negli animali i fenomeni morbosi, che producono invece nel nostro organismo.

Quasi ciò non bastasse, havvi ancora un altro genere di difficoltà, che rende difficile il rintracciare nelle acque le forme patogene, e questa deriva dalla concorrenza vitale che si svolge fra esse e i batterì comuni delle acque; per cui può qualche germe infettante essere penetrato in quelle, e per mezzo di esse aver prodotto l' infezione, e non trovarsi più allorquando se ne intraprende la ricerca, perchè sopraffatto nel frattempo, ossia nel periodo d'incubazione della malattia, dalla concorrenza degli altri microrganismi.

Malgrado tali difficoltà, si è pur riusciti a scoprire nelle acque qualche germe patogeno, e precisamente i bacilli del tifo, quelli del colèra e quelli del carbonchio; ma sulla maniera di rintracciare questi germi nelle acque sospette si dirà meglio nei capitoli speciali, dedicati più innanzi a tali importanti microparassiti.

Non parlo qui di altri batterì, produttori di setticemia, trovati da Koch e da altri nelle acque molto impure, giacchè non possiamo, dalla conoscenza del potere patogeno che essi esercitano negli animali, dedurre che lo stesso avvenga anche per l'uomo;

(1) Finkelnburg, *Ueber einen Befund von Typhusbacillen im Brunnenwasser, nebst Bemerkungen über die Sedimentirmethode der Untersuchung auf pathogene Bacterien in Flüssigkeiten*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 9, 1891 pag. 301.

specialmente per ciò che la loro patogenicità è in istretta relazione colla via per la quale sono introdotti nell' organismo animale. E difatti gli stessi germi, che inoculati sotto cute nei piccoli animali producono in essi setticemia e morte, restano invece inoffensivi se introdotti per la via degli organi digerenti.

Questo fatto ne insegna ad essere cauti nell'attribuire la dovuta importanza all' esperimento negli animali, come mezzo di analisi batteriologica qualitativa delle acque, dal momento che possono queste riescire innocue negli animali ed essere nocive per l'uomo, o viceversa.

Ma oltre alla ricerca dei germi patogeni, l'esame qualitativo dell' acqua serve anche a rintracciare in questa la presenza di altri microrganismi, i quali nelle acque salubri e pure devono mancare assolutamente; e questi sono i microrganismi delle feci e della putrefazione. Quando questi si trovano in un'acqua, la si deve senz'altro dichiarare impura e pericolosa per la salute, anche se non vi sono germi patogeni, perchè la presenza di quei germi indica un inquinamento dell'acqua con sostanze organiche derivanti dalla vita dell'uomo e degli animali, colle quali possono da un momento all'altro trovarsi commisti anche microrganismi infettanti.

Trattandosi poi di acqua stagnante (cisterne), se in essa arrivano in copia sostanze organiche e germi della putrefazione, può l'acqua diventare corrotta e nociva per la salute, per opera dei prodotti tossici dello scambio materiale di quei batterî.

Allorquando si fa l'esame colla gelatina, siccome alcuni dei batterî più comuni della putrefazione (proteo volgare) la fluidificano, così la preponderanza delle *forme fondenti* può talvolta essere già essa un segno di poca purezza dell' acqua presa in esame. Questo semplice indizio però non ha il valore che una volta gli veniva attribuito, giacchè anche alcuni batterî acquatili comuni fluidificano la gelatina; non basta quindi la semplice numerazione delle forme fondenti, come prima si consigliava di fare, ma devesi anche in pari tempo stabilire la qualità delle specie batteriche che producono la fluidificazione, se si vuol trarne un giudizio esatto sulla purezza dell'acqua.

Dopo tutto ciò che si è detto riguardo all'analisi batteriologica delle acque, quantitativa e qualitativa, quali criterî possiamo dedurne per giudicare del grado loro di salubrità?

La risposta ad un tale quesito è tutt'altro che facile a darsi, viste le difficoltà di ogni genere, di cui è irto il campo di tali ri-

cerche. Il batteriologo, che è chiamato a giudicare della salubrità di un'acqua, pur rendendosi conto dell'importanza grande che ha per l'igiene un tal genere di esame, certamente al di sopra dell'analisi chimica, che prima invece si adoperava esclusivamente per quello scopo, deve però andar cauto, per non esagerare il valore, nè dei risultati quantitativi, nè di quelli qualitativi dell'esame batteriologico, giacchè è soltanto da un giusto apprezzamento degli uni e degli altri, uniti insieme, che si può ricavare un criterio valevole a giudicare rettamente dell'usopotabile di un'acqua.

Tavolta può anche la sola determinazione del numero di germi contenuti nell'acqua servire ad illuminarci nel nostro giudizio, e tal'altra invece no. E difatti, se si esamina l'acqua stagnante di una cisterna o quella di un pozzo, si può in essa trovare un gran numero di germi (anche oltre 500 o 1000 per cc.), senza che per questo si sia autorizzati a dichiararla insalubre; perchè possono benissimo quei germi appartenere tutti alle specie acquatili comuni, mentre invece basta che vi arrivino pochi esemplari di bacilli del tifo o del colèra, per addivenire causa di gravi malattie. Quando però si tratta di constatare l'efficacia dei filtri, e specialmente quella dei grandi bacini filtranti, destinati a depurare le acque superficiali, di fiume o di lago, che devono servire ad alimentare le città, allora è soltanto l'analisi batteriologica quantitativa dell'acqua filtrata, quella che ci dà un giusto criterio sul potere depuratore del filtro e sull'andamento della filtrazione. Basta infatti la constatazione di un aumento repentino nel numero dei microrganismi dell'acqua filtrata, per rivelarci un difetto nel procesao di filtrazione. Secondo Koch (1), allorquando l'acqua di filtrazione dei grandi bacini contiene più di 100 germi per cc. non dovrebbe più essere immessa nei serbatoj dell'acqua purificata. Ma oltre a ciò, anche nel caso di acqua sorgiva, condotta, la quale originariamente contiene pochi germi, o nessuno, il trovare nell'acqua, d'un tratto, un numero di germi superiore al normale, anche se questo numero non è molto grande, può tuttavia avere un grave significato e indicare un inquinamento accidentale avvenuto nell'acqua, il quale può esser pericoloso per la pubblica salute.

In ogni caso poi, oltre ai risultati dell'analisi, devesi pel giudizio della salubrità dell'acqua tener gran conto anche delle condizioni della località in cui l'acqua si trova, per vedere se havvi la possibilità di un inquinamento intercorrente. È così, se si tratta di acque superficiali che scorrono in mezzo a luoghi abitati, que-

(1) Koch, *Wasserfiltration und Cholera*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 14. 1893, pag. 393.

ste debbono senz'altro essere dichiarate insalubri e pericolose, perchè vi è sempre la possibilità che germi infettanti vi arrivino per mezzo delle dejezioni umane, o dalla lavatura della biancheria usata da persone infette: se poi si tratta di cisterna o di pozzo, si guarderà specialmente se la vicinanza di latrine, di fosse fisse e di letamaj, oppure le acque sporche superficiali possano per qualche via produrre l'inquinamento dell'acqua. Trattandosi finalmente di acqua condotta, l'esame locale ha importanza specialmente pel tratto della condotta che è in muratura, dove l'acqua non scorre sotto pressione e dove facilmente possono aver luogo infiltrazioni dall'esterno.

Non possiamo che raccomandare caldamente ai batteriologi di tenere conto esatto di tutto ciò che siamo andati esponendo sull'esame dell'acqua, e sul giudizio della sua salubrità, perchè il problema della scelta di una buona acqua da bere è assai importante per l'igiene pubblica, ed è pur troppo difficile a risolversi, sia per stabilire la diagnosi di salubrità, come anche per trovare in natura un'acqua che sia pura, e che si possa mantenere tale fino al momento di adoperarla.

Per ovviare a quest' ultima difficoltà, si è cercato di rendere artificialmente pura l'acqua che di natura non lo è, e si sono proposti per ciò varî mezzi, dei quali accenniamo qui soltanto a quelli che finora corrispondono meglio allo scopo, e che sono: la *filtrazione* e il *calore*.

Dei varî filtri proposti, formati da sostanze finamente porose, quali l'amianto, la porcellana, il carbone, la sabbia, la terra silicea fossile (*Kieselguhr*), alcuni sono destinati all'uso domestico, ed altri invece, molto più grandi, si sono proposti per filtrare l'acqua che deve servire ad alimentare le città. I piccoli filtri, pei quali è possibile metterli in azione colle dovute cautele, sono in grado di fornire acqua batteriologicamente pura, ossia priva di germi, ma soltanto per un tempo limitato; dopodichè il filtro diventa anzi un vivaio pei germi che trattiene, i quali passano anche nell'acqua di filtrazione. I grandi filtri poi, comunque costrutti, non riescono nello scopo, se non in parte, giacchè l'acqua filtrata contiene sempre un certo numero di microrganismi. È per ciò che i primi perchè di uso incomodo e malagevole, dovendosi continuamente ripulire e sterilizzare, i secondi perchè non rispondono allo scopo di una filtrazione perfetta, i filtri per l'acqua si può dire che non hanno corrisposto all' aspettativa che si aveva in principio sulla loro efficacia. Oggidì la filtrazione delle acque dev' essere considerata come un mezzo che non offre garanzia sicura di risultato per la loro purificazione, se non nel caso che l'acqua filtrata venga sottoposta ad un continuo controllo batteriologico, ed a patto che si proceda spesso alla ripulitura dell'apparecchio filtrante.

Abbiamo invece un mezzo sicuro di rendere innocua qualsiasi acqua da bere, nel *calore*. La semplice ebollizione, prolungata per un certo tempo, variabile da pochi minuti ad 1 ora, a seconda della quantità di acqua, serve ad uccidere sicuramente i germi infettanti che si possono trovare in essa commisti, e serve anche a sterilizzare l'acqua in maniera completa, salvo poche eccezioni, dovute alla presenza di spore estremamente resistenti, le quali per fortuna non appartengono a specie nocive.

L'ebollizione ha però l' inconveniente di privare l'acqua dei gas e di una parte dei sali che essa contiene, e di alterarne quindi alquanto le proprietà organolettiche ed alimentari.

È perciò che ora si è pensato giustamente di sostituire all'ebollizione semplice la sterilizzazione entro recipienti chiusi, sotto pressione, a temperatura superiore ai 100° C., riunendo così i vantaggi di una perdita minore dei sali e di una conservazione quasi completa dei gas, e di un certo risparmio nel combustibile, dovuto principalmente al fatto che non havvi più perdita di calore per opera dell'evaporazione dell'acqua.

Quanto al contenuto batterico delle diverse acque che si trovano in natura, diciamo soltanto che quelle superficiali sono sempre più o meno contaminate, ed in ogni caso da giudicarsi pericolose, come si è già detto. Le acque del sottosuolo invece, se raccolte da una certa profondità, e se il terreno soprastante e circostante è di tal natura da permettere una filtrazione perfetta, si trovano batteriologicamente pure. È necessario però raccoglierle non col sistema comune dei pozzi in muratura, giacchè in questi, e attraverso le pareti e dall'esterno, possono arrivare le impurità, ma sibbene per mezzo di tubi di ferro infitti nel terreno.

L'*acqua di pioggia*, come la *neve*, specialmente in principio, contiene germi che raccoglie dell'aria. Anche nei chicchi di *grandine* è stata dimostrata (1) la presenza di germi viventi; nè ciò può recar meraviglia, essendo dimostrato che il congelamento non uccide che in parte i germi contenuti nell'acqua, e che il ghiaccio proveniente da un'acqua impura si trova anch'esso inquinato da molti germi viventi, anche parecchi mesi dopo la sua formazione (2).

3. Esame batteriologico del terreno.

È questa una ricerca che potrebbe avere molta importanza per l'igiene, e precisamente per lo studio del ciclo vitale dei microparassiti al di fuori dell'organismo, ma che pur troppo finora non è stata ferace di risultati. Di molte infezioni difatti conosciamo gli elementi parassitarî e la loro maniera di comportarsi nell'organismo infetto; ma quale sia il loro destino ulteriore nel mondo esterno, se cioè, e fino a qual punto, essi trovino nel terreno, dove in generale vanno a finire colle sostanze di rifiuto e coi cadaveri delle persone infette, condizioni favorevoli alla loro conservazione e

(1) Bujwid, *Die Bakterien in Hagelkörner*, Centralbl. f. Bacteriologie Vol. III, 1888, pag. 1.
(2) Bordoni-Uffreduzzi, *Die biologische Untersuchung des Eises*, ecc. Centralbl. f. Bacter. Vol. II, 1887, pag. 489.

moltiplicazione, è questo un fatto che si può desumere ragionevolmente dalla conoscenza delle proprietà fisico-chimiche del terreno, ma che non si è potuto ancora dimostrare direttamente, se non per pochi microrganismi: sicchè finora si è costretti a confessare che l'esame batteriologico del terreno, come quello dell'aria, non ha dato quei risultati, che in principio pareva se ne potessero ottenere.

La ricerca dei germi del terreno non differisce essenzialmente da quella dell'acqua, e può anch'essa essere fatta in due modi: o mescolando direttamente colla gelatina il terreno polverizzato, oppure mescolandolo prima coll'acqua sterilizzata, e facendo con questa le culture nella maniera già esposta.

Qualunque dei metodi sia il prescelto, è necessario nella raccolta del materiale tener conto di due avvertenze principali, e cioè:

1.° che l'esame si faccia nel più breve termine possibile dopo raccolto il terreno, giacchè in questo succede rapidissima la moltiplicazione dei germi che vi si contengono. Non è quindi da consigliarsi, come da taluno si è proposto, di lasciar prima disseccare il terreno, perchè questo si disgreghi più facilmente e si mescoli meglio colla gelatina; e ciò anche perchè il disseccamento può nuocere a qualche microrganismo in esso contenuto.

Quando si preferisca operare direttamente colla gelatina, si può adottare l'espediente di disgregare il terreno, appena raccolto, per mezzo della sabbia secca, sterilizzata, e mescolarlo poscia colla gelatina.

2.° Si deve prendere per unità di misura del terreno da analizzare, non già il peso, il quale può variare di molto, a seconda del contenuto di acqua, ma sibbene il volume. Fränkel (1) ha suggerito per ciò di raccogliere il terreno con un piccolo cucchiaio di platino, sterilizzabile sulla fiamma, della capacità di $^1/_{50}$ di cc., a superficie rasa.

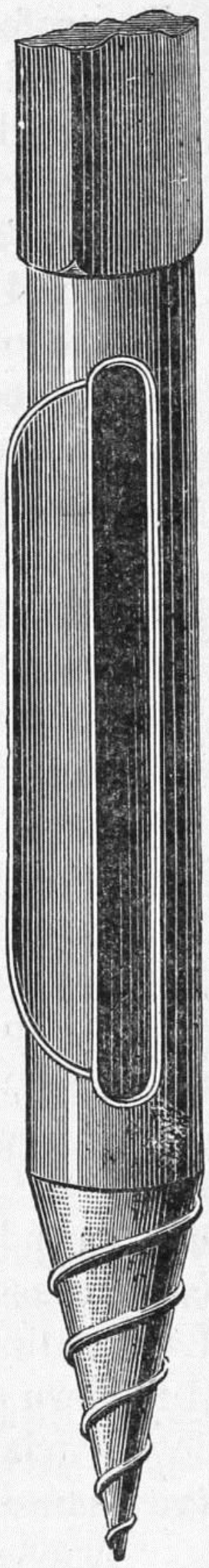


Fig. 48. Perforatore del terreno, di Fränkel.

Per raccogliere poi il terreno a diversa profondità, senza che si mescoli con quello degli altri strati, serve bene un *apparecchio perforatore*, speciale, costruito da Müncke dietro suggerimento dello stesso Fränkel, quale è rappresentato dalla fig. 48.

(1) Fränkel C., *Untersuchungen über das Vorkommen von Mikroorganismen in verschiedenen Bodenschichten*, Zeitschr. f. Hygiène. Vol. II, 1887, pag. 521.

Questo perforatore è munito di una piccola camera a forma di cucchiaio, posta al di sopra della parte perforante, la quale resta chiusa finchè l'istrumento si introduce facendolo girare da sinistra verso destra, e si apre, riempiendosi di terra, non appena, arrivato alla profondità voluta, lo si fa girare in senso contrario. Prima di estrarlo si richiude di nuovo, facendolo girare da sinistra verso destra, ed in tal modo si estrae, senza pericolo che vi penetri altro terreno.

Se l'analisi vien fatta colla gelatina, deve abbandonarsi l'antico metodo di distenderla sulle lastre di vetro e di lasciarvi cader sopra il terreno polverizzato, come si fa del sale sulle vivande, giacchè in tal modo i germi non arrivano a svilupparsi tutti, e non si sviluppano separati, ma sibbene sotto forma di colonie miste, attorno a ciascun granello del terreno. È preferibile invece mescolare intimamente colla gelatina, fatta fondere nei tubi, il terreno disgregato colla sabbia sterile e secca, e distendere poscia la gelatina sulle lastre o nelle scatole di vetro, oppure negli stessi tubi, alla Esmarch. È da consigliarsi inoltre di fare dal primo tubo di gelatina due o più diluzioni in altrettanti tubi, secondo il metodo classico di Koch, giacchè è necessario, come si è detto per l'analisi dell'acqua, tenere in osservazione le culture per 8-10 giorni almeno, per lasciar tempo ai germi d'incominciare lo sviluppo. Una tale precauzione è tanto più da raccomandarsi pel terreno, inquantochè Reimers (1) ha dimostrato che i germi provenienti da una certa profondità si sviluppano assai più lentamente, che quelli superficiali.

È preferibile quindi, quando si può, usare il metodo *misto*: mescolare, cioè, anzitutto un certo volume di terreno (1 cc.) con una grande quantità di acqua sterilizzata, e con questa fare le culture secondo gli stessi metodi indicati per l'analisi dell'acqua. La quantità di acqua da adoperarsi per la 1.ª diluzione, come anche il numero delle diluzioni successive, quando queste sieno necessarie, deve variare a seconda del quantitativo di germi nel terreno, giusta quanto si è detto per l'acqua.

Anche pel terreno è importante conoscere non soltanto il numero, ma anche la qualità dei germi che contiene. Qualunque sia però il metodo che si adopera, gli errori a cui si va incontro sono sempre grandi, giacchè le condizioni del terreno sono da un punto all'altro, anche a piccola distanza, variabilissime.

Oltre a ciò nel terreno sono numerose le specie anaerobiche, come pure quelle che vegetano a 50°, oppure a 0° C. Non bisogna

(1) Reimers, *Ueber den Gehalt des Bodens an Bacterien*, Inaug. Dissert. aus Jena, Leipzig 1889.

adunque trascurare di porre in pratica per tale esame batteriologico tutti quei mezzi, i quali permettono di rivelare, oltre la presenza dei comuni batterî, anche quella degli altri sopraccennati.

Finalmente resta ancora la ricerca dei germi patogeni; e questa non può farsi soltanto mediante le culture, per ragioni facili a comprendersi, ma bisogna farla invece specialmente coll'innesto negli animali. Si pratica per ciò generalmente l'innesto sottocutaneo, introducendo una certa quantità di terreno in una o più saccoccie scavate sotto la cute dei piccoli animali, dai quali poscia si ricava colle culture la forma patogena sviluppata nell'organismo.

I dati principali, raccolti finora coll'esame batteriologico del terreno, si riferiscono alla presenza di qualche germe patogeno negli strati superficiali, e alla diversa distribuzione dei germi negli strati profondi.

Tutti coloro che si sono occupati di tali ricerche sono concordi nello ammettere, che mentre i batterî si trovano numerosissimi alla superficie, diminuiscono invece rapidamente di numero anche a poca profondità, finchè a 3-4 metri, naturalmente là dove non esistono depositi sotterranei di sostanze organiche, si trova il terreno privo affatto di germi viventi, e solo eccezionalmente se ne trova ancora qualcuno a 6 metri di profondità. È questo un fatto molto importante per l'igiene, giacchè, corrispondentemente a ciò, l'acqua del sottosuolo si trova spesso priva di microrganismi. È da notarsi però che la presenza, o meno, di microrganismi nell'acqua del sottosuolo dipende non solo dalla sua maggiore o minore profondità, ma anche, e specialmente, dalla presenza in esso di sorgenti di inquinamento (canali neri, fosse fisse, ecc.) e dal potere di filtrazione del terreno soprastante, e quindi dalla sua costituzione.

Questo fa sì che, mentre ad es. Fränkel (1) ha trovato a Berlino l'acqua del sottosuolo sterile affatto a circa 4 m. di profondità, a Torino invece ho potuto più di una volta constatare che l'acqua raccolta coi tubi metallici, anche da oltre 10 m. di profondità, contiene ancora un discreto numero di germi viventi.

Con tutto questo il sistema dei tubi metallici, per raccogliere l'acqua del sottosuolo per gli usi domestici, è da raccomandarsi caldamente a preferenza di quello comune dei pozzi in muratura; sia perchè attraverso le pareti di questi è sempre possibile l'inquinamento dell'acqua, e sia anche perchè, una volta inquinati, se si tratta di pozzi comuni, riesce quasi impossibile il disinfettarli. I pozzi metallici invece escludono la possibilità di inquinamento dal terreno circostante, attraverso le pareti, e si possono disinfettare ad ogni momento con molta facilità.

(1) Fränkel, *Untersuchungen über Brunnendesinfection und den Keimgehalt des Grundwasser*, Zeitschr. f. Hygiène Vol. 6°, 1889, pag. 23.

Un altro fatto importante, che risulta dalle analisi batteriologiche degli strati profondi del terreno (Reimers), si è che nei cimiteri, sia all'intorno come al di sotto del luogo di seppellimento dei cadaveri, sia molti anni, come poco tempo dopo avvenuta l'inumazione, il contenuto di germi del terreno non differisce sensibilmente da quello delle località circostanti. È questo un fatto, che viene a conferma di quanto fu osservato da Petri sull'acqua di filtrazione del terreno dei cimiteri, e che toglie gran peso ai timori esagerati, che si aveano per lo addietro sui pericoli per l'igiene provenienti da tali località.

Negli strati superficiali del terreno è stata dimostrata anche la presenza di alcuni germi patogeni, principalmente sotto forma di spore: questi sono i bacilli del carbonchio, dell'edema maligno (Pasteur, Koch), del tetano (Nicolayer) e del tifo addominale (Macè).

Ma la grande maggioranza dei germi del terreno è composta da batterî, i quali trasformano le sostanze organiche, sia operando la riduzione dei nitrati negli strati profondi, e sia trasformando l'ammoniaca in acido nitrico, ed ossidando gli idrati di carbonio con produzione di CO^2, negli strati superficiali del terreno. Diciamo infine che nel terreno si trovano predominanti le forme bacillari e le spore, le quali sono appunto in condizione di meglio resistere all'azione nociva degli agenti fisici esterni, essiccamento, luce solare, ecc., i quali minacciano continuamente la loro esistenza.

CAPITOLO VII.

Descrizione biologica dei principali microrganismi patogeni.

1. Bacillo del carbonchio.

Osservato quasi contemporaneamente da Pollender, da Brauell e da Rayer e Davaine (1849-50) nel sangue degli animali carbonchiosi, fu poscia studiato specialmente da Davaine, il quale riprodusse sperimentalmente la malattia coll'innesto del sangue contenente i bacilli (1863), e da Bollinger, il quale distinse il vero carbonchio dal così detto « carbonchio sintomatico ». I progressi più notevoli però sulla conoscenza delle proprietà fisiologiche e morfologiche di questo bacillo si devono alle celebri ricerche di Pasteur (1) e di Koch (2), il quale ultimo riuscì a coltivare isolatamente il bacillo fuori dell'organismo animale, e a riprodurre la malattia negli animali coll'innesto delle culture pure, seguendo in pari tempo lo sviluppo del bacillo in tutte le sue fasi, dalla segmentazione delle forme bacillari alla formazione delle spore e alla loro germinazione.

I bastoncini del parassita, quali si osservano nel sangue di animali affetti da carbonchio (Tav. V, fig. 5 e 6), hanno una lunghezza variabile da 3 a 10 μ, uno spessore di 1,0-1,25 μ, e moltiplicandosi rapidamente per scissione, appaiono spesso sotto forma di filamenti, più o meno lunghi, i quali hanno un aspetto diverso, a seconda che si osservano allo stato naturale, oppure mediante l'aiuto dei mezzi di colorazione.

Se incolori, i filamenti del bacillo carbonchioso appaiono uniformi, e se invece sono trattati colle sostanze coloranti d'anilina,

(1) Pasteur, *Étude sur la maladie charbonneuse*, Comptes rendus, t. 84, 1887. — *Charbon et sèpticemie*, Ibid. t. 85, 1887. — *Sur la vaccination charbonneuse*. Ibid. 1883 — *La vaccination charbonneuse. Réponse au doct. Koch.* Revue scientifique, 20 janv., 1883.

(2) Koch, *Die Aetiologie der Milzbrand-krankheit*, ecc, Cohn's Beiträge, Bd. II. 1876. — *Zur Aetiologie d. Milzbrandes*, Mitth. a. d. kais. Ges. 1887. — *Ueber Milzbran dimpfung*, Kassel. u. Berlin, 1882.

si vedono in essi i singoli bacilli colorati, separati da uno spazio incoloro, si vede cioè la « segmentazione » dei filamenti nei bacilli da cui sono composti. Questa segmentazione appare specialmente manifesta nei preparati tinti coi colori bruni di anilina, ma si mette anche facilmente in evidenza colorando i preparati coll'azzurro di metilene, oppure col violetto di metile o di genziana, e decolorandoli poscia leggermente coll'alcool.

Gli stessi bacilli hanno poi un aspetto differente, a seconda che provengono dalle culture, o dal sangue degli animali infetti.

Nelle culture i bacilli sono un poco più corti, ed i filamenti che risultano dall'aggregazione dei bacilli sono invece lunghissimi. Nel sangue degli animali non si formano mai filamenti molto lunghi, e le estremità dei bacilli hanno un aspetto caratteristico: esse appaiono, cioè, rigonfiate leggermente a mo' di clava, ed hanno le superfici di sezione infossate nel mezzo. In tal guisa gli spazî chiari, che separano i singoli bacilli colorati, assumono una forma ovoidea, ed i filamenti si mostrano coll'aspetto di una canna di bambù. Tale aspetto risalta specialmente nei preparati tinti col bruno di Bismarck, o coll'azzurro di metilene.

Una tale proprietà morfologica è stata descritta da Koch, come caratteristica dei bacilli carbonchiosi, e può servire a distinguerli da altre forme consimili, che si trovano spesso nel sangue degli animali infetti, morti da qualche tempo, e che sono invece della putrefazione.

Un' altra caratteristica morfologica dei bacilli del carbonchio nel sangue si è la presenza di una *capsula*, non molto grande, che circonda tanto i bacilli isolati, come i filamenti, e che si rende facilmente evidente, trattando il preparato colla soluzione Ehrlich di genziana, e decolorandolo poscia leggermente coll'alcool. La capsula non si osserva mai nei bacilli provenienti dalle culture.

Il bacillo carbonchioso non ha ciglia, ed è quindi sprovvisto di movimenti proprî, qualunque sieno le condizioni in cui si fa sviluppare.

Lo sviluppo di questo microrganismo ha un decorso ciclico, ben determinato, che si può facilmente seguire coll'osservazione microscopica nelle culture « a goccie pendenti », purchè si mantengano ad una temperatura conveniente. I bacilli riproduconsi per scissione, formano i filamenti, e nell'interno di questi, verificandosi le condizioni necessarie, di cui è parola più sotto, appaiono dapprima nel protoplasma bacillare numerosi granuli, i quali poscia si raccolgono verso il centro della cellula e costituiscono la *spora*, ovale e fortemente rifrangente. Le spore, disposte uniformemente nell'in-

terno dei filamenti, impartiscono a questi l'aspetto di un rosario. In uno stadio ancora più avanzato, il resto del protoplasma bacillare si discioglie e le spore rimangono libere. Se poi le spore si trasportano in un terreno nuovo di nutrizione e si tengono in condizioni opportune, germogliano e riproducono così la forma bacillare da cui hanno avuto origine.

Le condizioni necessarie per la *sporificazione* del bacillo carbonchioso sono rappresentate da una conveniente composizione del substrato nutritivo, dalla presenza di ossigeno libero, e da un certo grado di temperatura, il quale oscilla fra 20° e 40° C. circa. Tenendo conto di tali condizioni, per avere una sporificazione rapida ed abbondante di questo bacillo, come è necessario quando si vuole preparare il materiale per lo studio dei disinfettanti, se ne farà la cultura sulla superficie dell'agar o delle patate, oppure in piccole quantità di brodo, a 37° C. Se si fa la cultura in una colonna alta di liquido, spesso accade che i bacilli precipitano in fondo, dove è difficile l'accesso dell'ossigeno, e resta quindi ostacolata la sporificazione. Per la stessa ragione nell'interno dell'organismo animale intatto i bacilli carbonchiosi non formano spore, mentre invece, appena i bacilli vengono emessi nel mondo esterno, sia coll'orina e colle feci degli animali infetti, e sia fuoruscendo dal cadavere degli stessi animali interrati, sviluppandosi a contatto dell'O atmosferico, formano le spore.

La composizione chimica del substrato in cui si sviluppano non ha influenza nella sporificazione per mezzo dell'esaurimento dei materiali nutritizi, come prima si credeva, ma ha influenza piuttosto per ciò che, se la composizione del mezzo è poco adatta per lo sviluppo del bacillo, invece di formarsi le spore, ha luogo una degenerazione dei bacilli, che si manifesta colle così dette « forme involutive », tozze ed irregolari.

Un fatto interessante, osservato e studiato la prima volta da Roux e Chamberland (1), e poscia da Lehmann (2) e da Behring (3), si è che il bacillo carbonchioso, fatto sviluppare in certe condizioni, poco favorevoli, perde la facoltà di sporificare, pur conservando la sua virulenza, e si trasforma così in una varietà detta *asporigena,* la quale, sia coltivata nelle condizioni di nutrizione e di temperatura più convenienti, come anche fatta sviluppare nell'organismo animale, non riacquista più la proprietà di formare le spore.

(1) Comptes rendus. Acad. d. Sc. 1883, p. 1090.
(2) Lehmann, *Ueber die Sporenbildung bei Milzbrand*, Munch. med. Wochenschr. N. 26, 1887.
(3) Behring, *Beiträge zur Aetiologie des Milbrandes*, Zeitschr. f. Hygiene. Vol. 7, 1889 p. 171.

La varietà asporigena del bacillo carbonchioso si può ottenere mescolando al brodo, dove quello si fa sviluppare, piccole quantità di sostanze antisettiche, come ad es. l'acido fenico (8: 10000) o il bicromato potassico (1: 2000), facendo in pari tempo arrivare l'aria nelle culture in iscarsa quantità (Roux (1)). Secondo Behring, la metà od il terzo delle dosi antisettiche di certe sostanze chimiche, necessarie per impedire lo sviluppo del bacillo carbonchioso, serve per impedire o diminuire la formazione delle spore. Lehmann invece trovò a caso i bacilli carbonchiosi asporigeni in vecchie culture in gelatina, conservate nel laboratorio di Koch, senza che vi entrasse l'azione di alcuna sostanza antisettica. Phisalix (2) ha ottenuto i bacilli asporigeni, coltivandoli a 42° C. per un certo numero di generazioni.

Le spore del bacillo carbonchioso hanno un forte grado di resistenza, e vengono perciò adoperate come « oggetto di prova », per saggiare la potenza dei disinfettanti; giacchè se un dato mezzo riesce ad uccidere le spore del carbonchio, si può considerare come sicuramente attivo verso qualsiasi altro agente infettivo.

A tal uopo si prepara una cultura ricca di spore, nel modo già detto, se ne fa un' emulsione, piuttosto densa, nell'acqua sterilizzata, e con questa si impregnano pezzetti di carta bibula o fili di seta, sterilizzati, i quali si pongono a contatto col disinfettante, dopo averli essiccati.

La resistenza delle spore carbonchiose è molto più grande di quella dei bacilli, sia ai mezzi chimici, come a quelli fisici, temperatura ed essiccamento. Così, mentre i bacilli, tenuti a 65° C. per 15 minuti, muoiono sicuramente, le spore invece resistono alla temperatura di 90° C. per 15 minuti e per 10 minuti a quella del vapor d'acqua a 100° C. Se poi la temperatura è secca, resistono anche a gradi molto più elevati (140° C.). I bacilli resistono anche poco all'azione del disseccamento, mentre le spore disseccate possono mantenersi viventi per molti anni. Lo stesso accade delle spore tenute nell'alcool. Conosciamo un solo agente fisico, il quale ha un'azione nociva potente sulle spore del carbonchio, ed è la luce solare diretta. Secondo Roux (3) possono bastare 29-30 ore di insolazione, a contatto dell'aria, per uccidere le spore carbonchiose.

Riguardo alla resistenza di queste spore, notiamo ancora un fatto importante, osservato da Esmarch (4), che, cioè, il grado loro di resistenza può andare soggetto a variazioni molto notevoli a seconda della loro origine diversa. Vi sono infatti spore carbon-

(1) Roux, *Bactéridie charbonneuse asporogène*, Annales de l'Institut Pasteur, 1890, pag. 25.

(2) Le Bulletin médical, 1892, pag. 293.

(3) Roux, *De l'action de la lumière et de l'air, ecc.* Annales de l'Institut Pasteur, 1887, pag. 445.

(4) Esmarch, *Die Milzbrandsporen als Testobject bei Prüfung von Desinficientien*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. V, 1889, pag. 67.

chiose, che nell'acido fenico al 5 % muoiono dopo 2 giorni, e muoiono in 5 minuti nel vapor d'acqua a 100° C., mentre altre spore della stessa natura resistono nella stessa soluzione fenica per oltre 40 giorni, e per 10-12 minuti nel vapor d'acqua a 100° C. La causa di queste differenze è ancora ignota. A noi basti per ora segnalare il fatto, per porre nell'attenti chi vuole adoperare siffatto materiale per le esperienze sui disinfettanti, acciocchè venga in precedenza saggiato il potere suo di resistenza con uno dei mezzi sopraindicati.

La colorazione dei bacilli si ottiene facilmente anche colle soluzioni acquose semplici degli ordinarî colori d'anilina, come anche col metodo di Gram: adoperando questo metodo per le sezioni dei tessuti, si può ottenere col carmino, o col picrocarmino, la colorazione doppia, o tripla, di contrasto fra i microrganismi e i diversi componenti del tessuto. Ricordiamo a questo proposito un particolare: ed è che, adoperando il metodo di Gram, spesso il jodo altera il protoplasma dei bacilli carbonchiosi, in modo che questi assumono l'aspetto di ammassi granulosi, rotondeggianti, e difficilmente si riconoscono per bacilli del carbonchio.

Per colorare le spore del bacillo carbonchioso, serve molto bene il metodo seguente, proposto da Moeller (1). Il preparato, fissato sul vetrino facendolo passare per tre volte attraverso la fiamma, oppure tenendolo per 2 minuti nell'alcool assoluto, si tiene per 4 minuti nel cloroformio, si lava con acqua, si immerge per 1-2 minuti in una soluzione di acido cromico 5 %, si lava abbondantemente con acqua, e si tiene a contatto della soluzione Ziehl di fucsina, riscaldata, per 5 minuti; fatto ciò, si decolora nell'acido solforico diluito al 5 %, si lava di nuovo abbondantemente con acqua, si lascia per 30 secondi in una soluzione acquosa di azzurro di metilene, o di verde di malachite, e si lava con acqua. Le spore appaiono colorate in rosso, e i bacilli in azzurro, od in verde.

Il bacillo del carbonchio è eminentemente *aerobio*, e nei mezzi di cultura artificiali, se manca l'O libero, non si sviluppa.

Cresce con rigoglio in tutti i mezzi ordinarî di cultura, purchè sia tenuto ad una temperatura conveniente. I limiti di temperatura, entro cui è possibile lo sviluppo del bacillo, sono rappresentati da 15° e 45° C.; il grado ottimo oscilla fra 30° e 37° C.

Nella gelatina si sviluppa con aspetto caratteristico, sia nelle culture fatte per infissione, come nelle culture piane. La cultura per infissione presenta nei primi giorni, non sempre però, ma di

(1) Moeller, *Ueber eine neue Methode der Sporenfärbung*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. X, 1891, pag. 273.

preferenza quando il bacillo è molto virulento, l'aspetto di barbe di piuma, tutto attorno al canale d'innesto (Tav. III, Fig. 1): la gelatina a poco a poco si discioglie, non sotto forma di imbuto, ma uniformemente in tutta l'estensione del cilindro, cominciando dagli strati più superficiali e progredendo lentamente verso quelli profondi. L'ammasso dei bacilli sviluppati si raccoglie dapprima al fondo della parte disciolta, ed infine sul fondo del tubo con un aspetto simile a fiocchi di cotone, mentre la gelatina fluida soprastante resta perfettamente limpida e trasparente. — La reazione della gelatina si fa acida.

Nelle culture piane le piccole colonie, osservate al microscopio, offrono, quando sono superficiali, l'aspetto del così detto « *caput Medusae* » (Tav. III, Fig. 4); si vede, cioè, ai margini della colonia un intreccio fittissimo e vario di filamenti, nei quali, facendone preparati per schiacciamento e colorandoli, si possono osservare, con ingrandimenti forti, i bacilli e i filamenti da cui sono composti.

Sulla superficie dell'agar, disposta nei tubi obliquamente, il bacillo del carbonchio si sviluppa sotto forma di uno strato biancogrigiastro, non splendente, facilmente distaccabile, lateralmente al quale si osserva, in principio di sviluppo, la stessa disposizione a barbe di piuma che nella gelatina.

Si sviluppa egualmente bene sulla superficie delle patate, formandovi uno strato secco, biancastro, ricchissimo di spore, allorquando le culture sono tenute ad una temperatura conveniente.

Nel siero di sangue lo sviluppo del bacillo ha nulla di caratteristico, all'infuori del fatto che il siero solido viene da esso lentamente fluidificato. Cresce rigoglioso anche nel brodo alcalino, ed in una quantità di infusi vegetali, di vario genere (fieno, orzo, ecc.).

Nelle culture del bacillo carbonchioso è stata dimostrata la presenza di sostanze tossiche, appartenenti alcune al gruppo delle albumine (Hankin, Martin, Brieger e Fränkel) ed altre al gruppo delle ptomaine (*antracina* di Hoffa). È a queste sostanze che verosimilmente si deve, in gran parte almeno, l'azione patogena del bacillo carbonchioso. Lo studio dei prodotti dello scambio materiale di questo bacillo è però finora incompleto. Ricordiamo ancora al riguardo il fatto osservato da Behring, che quei prodotti in genere sono diversi a seconda del grado di virulenza del microrganismo, giacchè, mentrei bacilli virulenti producono sostanze acide in abbondanza, quelli attenuati invece producono di preferenza sostanze alcaline.

Il fenomeno dell'*attenuazione* del potere patogeno di questo microrganismo, la quale si può, come si è detto, ottenere artificialmente in varî modi, ha un'importanza pratica speciale, perchè col-

l'innesto delle culture attenuate si possono rendere immuni gli animali contro il carbonchio. Si è già detto quale sia il processo di preparazione dei due vaccini (1.° e 2.°) secondo il metodo Pasteur, e quali i risultati ottenuti dall'applicazione pratica delle vaccinazioni anticarbonchiose.

La questione dell'immunità pel carbonchio è stata in questi ultimi tempi studiata attivamente da molti punti di vista. Essa è stata infatti il pernio principale intorno a cui si è aggirato lo studio della questione della *fagocitosi*, come causa dell' immunità, per opera di Metschnikoff e dei suoi numerosi sostenitori e contradittori, ed è stata così oggetto di un numero grandissimo di lavori scientifici.

Si è ottenuta l'immunità artificiale pel carbonchio, non soltanto coll'innesto delle culture attenuate, ma anche con quello delle culture virulente sterilizzate (Roux e Chamberland (1)), con un albuminato alcalino, ottenuto dall'estratto acquoso dei testicoli e del timo di animali sani (Wooldridge (2)) e con una sostanza tossica albuminoide, isolata da Hankin (3) dalle culture del bacillo carbonchioso. Si è anche riuscito a preservare gli animali dall' infezione, dopo fatto l'innesto dei bacilli virulenti, mediante l'introduzione di altri microrganismi. Emmerich (4) ha ottenuto ciò coll'innesto dello streptococco e risipelatoso, Pawlowsky (5) con quello del pneumobacillo di Friedländer, Bouchard (6) con quello del bacillo piocianeo. Lo stesso risultato hanno pure ottenuto Kostjurin e Kraïnsky (7), iniettando negli animali inoculati di carbonchio le tossine estratte dalla carne putrefatta.

Il bacillo carbonchioso è un parassita facoltativo, ed anzi si può dire che di regola è un saprofita, e che solo eccezionalmente vive una vita parassitaria. Con tutto ciò esso gode di un altissimo potere infettante, tanto che bastano pochi esemplari, introdotti nell'organismo di un animale sensibile, per produrre l'infezione e la morte.

Le specie animali suscettibili per l'infezione carbonchiosa sono assai numerose. Citiamo fra i più sensibili i bovini, gli ovini e gli

(1) Chamberland e Roux. Lavoro citato.

(2) Wooldridge, *Versuche uber Schutzimpfung auf chemischen Wege*, Archiv. f. Anatomie, u. Physiologie. Physiol. Abtheil. Vol. 3, 1888. p. 261.

(3) Hankin, *Immunity produced by an albumose isolated from Anthrax*, Britisch med. Journal 1889, p. 210.

(4) Emmerich, *Die Heilung des Milzbrandes*, Archiv. f. Hygiene. 1887, p. 442.

(5) Pawlowsky, *Heilung des Milzbrandes durch Bacterien*, ecc. Virchow's Archiv 1887, p. 494.

(6) Bouchard, *Influence qui éxerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du bacille pyocianique*, Comptes Rendus 1889, p. 713.

(7) Kostjurin u. Kraïnsky, *Ueber Heilung des Milzbrandes durch Fäulnisstoxine (Extracte) bei Thieren*, Centralbl. f. Bacteriologie Vol. X, 1891. pag. 553

animali comuni da esperienza, cavie, conigli e topi. Di questi ultimi la razza bianca piccola (*mus musculus*) è la più sensibile, mentre i ratti bianchi godono un'immunità, se non assoluta, certamente assai notevole per quest'infezione.

Secondo Behring (1), un tal fatto dipenderebbe specialmente dal grado molto elevato di alcalinità che ha il sangue dei ratti. E difatti, mentre il bacillo del carbonchio non si sviluppa nel siero di sangue normale di questi animali, si sviluppa bene invece nel siero sanguigno degli stessi animali, trattati precedentemente con iniezioni di acido ossalico.

Un'altra eccezione curiosa è rappresentata dall'immunità che gode pel carbonchio una razza di montoni di Algeria, mentre le altre razze tutte di questi animali sono assai suscettibili per tale infezione.

Il cane rappresenta una specie animale poco sensibile pel carbonchio: sono poi completamente immuni, o quasi, la maggior parte degli uccelli e gli anfibî. Si può però tanto alle rane, come ai polli, far perdere facilmente la loro immunità naturale, aumentando nelle prime e diminuendo nei secondi artificialmente la temperatura del corpo.

Negli animali sensibili pel carbonchio si può produrre l'infezione per qualunque via venga introdotto il materiale infettante, sia essa la pelle o il tessuto sottocutaneo, oppure l'apparecchio respiratorio, o quello digerente; ma il quadro morboso varia alquanto, a seconda della diversa porta d'ingresso del virus.

Negli animali morti in seguito all'innesto cutaneo, o sottocutaneo, si trova tutto attorno al luogo dell'innesto un edema gelatinoso, speciale, assai diffuso, nel cui liquido si trovano abbondanti i bacilli del carbonchio. Questo edema si differenzia da quello prodotto dal bacillo dell'edema maligno, per ciò che non è accompagnato da sviluppo di gas. Oltre all'edema non havvi altro segno caratteristico del carbonchio, all'infuori dell'ingrossamento notevole della milza, la quale appare di colore nerastro ed estremamente molle.

I bacilli si trovano nel sangue, isolati o riuniti in catene di 2-6 membri tutt'al più, ed occupano specialmente il distretto dei capillari sanguigni, i quali restano da essi quasi otturati completamente.

Il quadro dell'infezione carbonchiosa è stato generalmente descritto come il tipo della setticemia, giacchè i bacilli si trovano quasi esclusivamente limitati al

(1) Behring, *Ueber die Ursache der Immunität von weissen Ratten*, Centralbl. f. klin. Medicin. 1888, N. 20.

sistema vascolare sanguigno. Secondo però le osservazioni di Frank e Lubarsch (1), il bacillo del carbonchio si sviluppa dapprima, e specialmente, nel luogo d'innesto, e solo più tardi si diffonde nell'interno dei vasi sanguigni. Siffatta diffusione ha luogo più o meno presto, a seconda della maggiore o minore ricchezza vascolare del luogo d'innesto, ma in ogni caso la moltiplicazione dei bacilli nel sangue ha luogo soltanto poche ore prima della morte; allorquando, cioè, in seguito alla moltiplicazione locale dei bacilli e alla diffusione dei loro prodotti, il sangue ha perduto le sue proprietà battericide. Anche nei piccoli animali, adunque, il carbonchio che si sviluppa in seguito all'innesto sarebbe una malattia primitivamente locale, come è nell'infezione naturale dell'uomo e dei grossi animali domestici.

Ciò sarebbe anche in relazione con quanto si osserva sul passaggio dei bacilli carbonchiosi dalla madre al feto; giacchè questo passaggio non si verifica sempre, ma soltanto in quei casi in cui i bacilli penetrano di buon'ora nel sangue ed arrivano alla placenta un certo tempo prima della morte.

Se il virus si introduce per la via degli organi respiratorî, gli effetti sono diversi, come Buchner ha dimostrato, a seconda che si tratta di spore o di bacilli. Facendo inalare agli animali un'emulsione di spore carbonchiose, ha luogo la penetrazione dei germi nell'interno dell'organismo e l'infezione generale, senza che localmente, nei polmoni, si trovi traccia di reazione infiammatoria; se invece l'esperienza si fa coi bacilli senza spore, l'infezione generale è poca cosa, e si produce invece un'infiammazione del polmone, una vera polmonite, con moltiplicazione locale dei bacilli introdotti.

E così allorquando il virus viene introdotto per gli organi digerenti, se si tratta di bacilli, questi vengono generalmente distrutti per opera del succo gastrico, mentre invece le spore passano inalterate nell'intestino, donde, germogliando e moltiplicandosi, possono penetrare nell'interno dell'organismo e produrre l'infezione. È questa anzi la via per cui generalmente si produce l'infezione carbonchiosa negli animali domestici, nei quali i germi si introducono di preferenza per mezzo degli alimenti, o per mezzo dell'acqua (2).

Nell'uomo invece l'infezione carbonchiosa nel più dei casi ha per punto di partenza una ferita della pelle, e si manifesta anzitutto coi sintomi locali della così detta « pustola maligna ». Vanno soggetti infatti a questa malattia specialmente coloro, che per la loro professione sono costretti a maneggiare gli animali, vivi o morti, come sono appunto gli stallieri, i macellaj, i conciapelli, ecc.

Qualche volta però anche nell'uomo può l'infezione avvenire

(1) Frank u. Lubarsch, *Zur Pathogenese des Milzbrandes bei Meerschweinchen und Kaninchen*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. XI, 1892 p. 259.

(2) Diatroptoff, *Bactéries charbonneuses dans la vase du fond d'un puits*, Annales de l'Institut Pasteur, 1893, pag. 286.

dal tubo digerente o dall'apparecchio respiratorio, come si verifica ad es. talvolta negli individui addetti alla scelta degli stracci (malattia dei cenciaiuoli).

Da ciò che si è esposto finora, risulta chiaramente che per la profilassi del carbonchio, tanto per l'uomo, come per gli animali domestici, ha importanza grandissima, sia la disinfezione locale, durante e dopo la malattia, come il trattamento successivo dei cadaveri degli animali carbonchiosi. Questi, dove è possibile, devono essere bruciati tutti intieri, e dove non si può, devono essere sotterrati ad una profondità non minore di due metri, per impedire la formazione delle spore e la diffusione dei germi sulla superficie del suolo. Il trasporto di questi dalla profondità del terreno verso la superficie, per mezzo delle acque sotterranee, o per mezzo dei lombrici, come ha sostenuto Pasteur, è dimostrato che di fatto non avviene: nella profondità del terreno (2-3 m.) i bacilli carbonchiosi non solo non si moltiplicano, ma vengono piuttosto ben presto distrutti.

2. Bacillo dell'edema maligno.

È stato studiato specialmente da Koch (1) e da Gaffky (2), i quali hanno distinto col nome di « edema maligno » la malattia prodotta da questo bacillo. mentre Pasteur (3) lo aveva prima descritto come agente produttore di una forma speciale di setticemia, sotto il nome di « *vibrion septique* ». — I bastoncini sono lunghi press' a poco come quelli del carbonchio, e sono per lo più riuniti a due a due, oppure anche in filamenti di 20-40 μ (Tav. V, fig. 8). Si possono quindi, a primo aspetto, confondere con quelli del carbonchio, ma si distinguono facilmente da questi per molti caratteri, anche semplicemente morfologici.

I bacilli dell'edema sono infatti più sottili di quelli del carbonchio, hanno le estremità arrotondate, e sono provvisti di ciglia, le quali colorate col metodo Löffler appaiono disposte non solo alle estremità, ma anche lungo l'asse maggiore del bacillo. Corrispondentemente a ciò i bacilli sono *mobili*, ma perdono rapidamente questa loro proprietà a contatto dell'O atmosferico.

Ancora più spiccate sono poi le differenze biologiche fra le due specie di bacilli. Il bacillo dell'edema maligno è infatti assolutamente *anaerobio*, e quindi non si sviluppa se non lungi dall'O libero. È perciò che l'innesto cutaneo semplice di questo bacillo non serve a produrre l'infezione, ma è necessario invece l'innesto sottocutaneo, fatto mediante l'iniezione colla siringa, oppure introducendo il materiale in una saccoccia profonda scavata sotto la pelle degli ani-

(1) Mitth. a. d. kais. Ges. Bd. 1, p. 54.
(2) Gaffky, *Experimentelle erzeugte Septicämie.* Ibid. p. 80.
(3) Bull. de l'Acad. de méd. 1877, p. 783.

mali, e richiudendo poscia con collodion la ferita esterna. Per coltivare adunque questo microrganismo, bisogna usare qualcuno dei metodi di cultura anaerobica. Esso si sviluppa bene alla temperatura ambiente (16-20° C.), come a 37°: il grado ottimo di temperatura è compreso però fra 37° e 39° C. Al di sopra di 20° forma spore. La spora è alquanto più grossa del bacillo, ed è situata per lo più nella parte mediana di esso.

Nella gelatina si sviluppa sotto forma di colonie rotonde, circondate da un alone sferico di gelatina liquefatta. Esso infatti fluidifica rapidamente la gelatina con sviluppo di gas, il quale ha odore di formaggio guasto. — Lo sviluppo di gas si ha più abbondante nei mezzi contenenti glucosio e nelle culture tenute a 37° C.

Si sviluppa anche bene nell'agar, nel siero di sangue e sulle patate. In questi mezzi lo sviluppo del bacillo ha poco o nulla di caratteristico, all'infuori dello sviluppo di gas, che si osserva dappertutto.

Aggiungendo all'agar il formiato o il solfoindigotato di soda, nelle proporzioni già dette per la cultura degli anaerobî, si può ottenere lo sviluppo del bacillo, anche facendo semplicemente l'innesto per infissione nei tubi di agar ordinarî, in presenza dell'aria.

Per ottenerlo in cultura pura, val meglio prendere il materiale d'innesto dagli organi interni degli animali, inoculati con uno qualunque dei numerosi materiali, in cui questo microrganismo si trova abbondantemente diffuso, specialmente sotto forma di spore. Esso infatti si trova in abbondanza nella terra di giardino, nella polvere delle stanze e delle strade, nel contenuto intestinale degli animali ed in quello delle cloache, come in generale in tutte le acque immonde.

Basta introdurre una certa quantità di questi materiali (in generale si usa la terra di giardino) sotto la cute di una cavia, colle precauzioni già dette, perchè l'animale muoia dopo 24-48 ore per infezione da bacillo dell'edema maligno. Alla necroscopia si trova, diffuso a tutto il corpo, un edema sottocutaneo crepitante (gas), nel cui liquido, fortemente puzzolento, si trovano abbondanti i bacilli ora descritti, insieme però a molte altre forme di microrganismi, e la carne muscolare degli animali infetti appare colorita di un rosso intenso, come se fosse tinta con fucsina.

I bacilli mancano generalmente, o si trovano molto scarsi nel sangue, se la necroscopia è fatta appena dopo la morte. Se invece è trascorso un certo tempo, i bacilli penetrano nel sangue e vi si moltiplicano. Corrispondentemente a ciò, nelle sezioni degli organi non si trovano bacilli (oppure sono assai scarsi) nell'interno di essi, ma sono invece abbondanti alla loro periferia, al di sotto del rive-

stimento sieroso. È questa una differenza molto notevole, da ciò che si osserva per l'infezione carbonchiosa.

E da notare però che havvi un animale, ed è il topo, che fa eccezione a questa regola, giacchè in esso i bacilli dell'edema maligno si trovano abbondanti nel sangue, e quindi anche negli organi interni (specialmente nel polmone), come nel carbonchio.

All'infuori dell'edema sottocutaneo, e del colorito rosso-vinoso delle carni muscolari, non si hanno in quest'infezione altre alterazioni patologiche, macroscopiche, importanti. Soltanto la milza è alquanto ingrossata e di color rosso-bruno, ed i polmoni fortemente congesti.

Alquanto diverso è il reperto necroscopico, allorquando l'innesto vien fatto, non già con una miscela di microrganismi, come è nella terra di giardino o negli altri materiali anzidetti, ma sibbene colle culture pure del bacillo dell'edema. Penzo (1) ha dimostrato che, analogamente a quanto si verifica pel bacillo del tetano, i microrganismi coi quali il bacillo dell' edema si trova commisto in natura, hanno una grande importanza nel determinare la moltiplicazione di esso nell'organismo animale, e quindi l' infezione. E difatti l'innesto di piccole dosi di cultura pura del bacillo non riesce mortale, e l'innesto di dosi più grandi uccide gli animali soltanto per opera dei veleni preformati, introdotti in un coi bacilli, giacchè non è possibile dimostrare una moltiplicazione di questi nel luogo di innesto.

Negli animali morti in seguito ad innesto delle culture pure, non si trova più l'edema vasto e puzzolento, ma si nota soltanto attorno al luogo d'innesto un'essudazione di siero sanguinolento, poco estesa (2). Mescolando invece le culture pure del bacillo con altre di proteo volgare, o di micrococco prodigioso, ed iniettandole negli animali, si ha la morte di questi collo stesso reperto, che si ha colla terra di giardino.

È interessante il fatto, pure osservato da Penzo, che se si innestano contemporaneamente nell'agar o nella gelatina, alla maniera ordinaria, il proteo volgare o il micrococco prodigioso, in un col bacillo dell'edema maligno, questo si sviluppa abbondante, come

(1) Penzo, *Contributo allo studio della biologia del bacillo dell'edema maligno*, Rendiconti della R Accademia dei Lincei, Vol. VII, 2. Sem. Fasc. 6, 1891.

(2) Questi fatti, la cui esattezza ho avuto anch'io occasione di constatare a parecchie riprese nelle esperienze di Penzo, sono stati contradetti da Sanfelice (Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 14, 1893, pag. 351), il quale afferma invece che, in seguito all'iniezione di spore del bacillo dell'edema, le cavie muoiono col quadro anatomico caratteristico dell'infezione, e che nel tessuto sottocutaneo si trovano i bacilli, abbondantemente moltiplicati. Faccio notare soltanto che S. non dice di aver fatto culture isolanti col liquido sottocutaneo delle cavie inoculate, per escludere sicuramente la presenza in esso di altri microrganismi.

nelle culture anaerobiche. Ciò serve a spiegare come il bacillo dell'edema possa trovarsi così diffuso in natura, anche in luoghi dove, come alla superficie del terreno, non manca certo l'O libero.

Il bacillo dell'edema, preso dalle culture come dall'interno dell'organismo animale infetto, si colora facilmente colle soluzioni idralcooliche semplici, ma non si colora col metodo di Gram.

Chamberland e Roux (1) si sono serviti di questo bacillo, per dare la dimostrazione più positiva della possibilità di rendere immuni gli animali mediante l'innesto dei prodotti solubili dell'attività vitale dei microrganismi. Basta difatti iniettare nelle cavie, entro la cavità addominale, le culture in brodo sterilizzate col calore o colla filtrazione, oppure il siero dell'edema, egualmente sterilizzato, per rendere questi animali sicuramente immuni dall'azione del bacillo virulento.

Fra gli animali sensibili per questa infezione annoveriamo in prima linea il topo, e poscia la cavia, il coniglio, il cane, il gatto, il maiale, la pecora, l'asino, il cavallo ed alcuni uccelli (colombi, galline).

Anche nell'uomo sono stati osservati casi di edema maligno. I primi sono stati descritti da Brieger ed Ehrlich (2), ed occorsero in due tifosi, in seguito ad iniezioni sottocutanee di tintura di muschio. La presenza dei relativi bacilli è stata più tardi anche sperimentalmente dimostrata nel muschio per opera di Cott (3).

3. Bacillo del carbonchio sintomatico.

Il così detto « carbonchio sintomatico » è una malattia diffusa dappertutto, ma che domina specialmente endemica in certe regioni, e colpisce il bestiame bovino, e più specialmente i vitelli giovani di 1 a 3 anni.

È stata anzitutto differenziata dal vero carbonchio, col quale non di rado si associa, per opera di Feser e Böllinger (1875-1876) e più tardi accuratamente studiata da Arloing, Cornevin e Thomas (4). Anch'essa domina, come il carbonchio, nei mesi estivi (da giugno a settembre) e si manifesta negli animali sotto forma di tumefazione, più o meno diffusa e crepitante, della pelle e della

(1) Chamberland e Roux, Lavoro citato.
(2) Berliner klin. Wochenschr. N.° 44, 1882.
(3) J. van Cott, *Untersuchungen über das Vorkommen der Bacillen des malignen Oedems in der Moschustinctur*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. IX, 1891, pag. 303.
(4) Arloing, Cornevin et Thomas, *Le charbon symptomatique du boeuf*, Paris, 1887.

muscolatura sottostante, che ha sede di preferenza nella coscia, nella spalla, o nel petto, ed è accompagnata da febbre e seguita dalla morte dell'animale dopo 36-40 ore.

Alla necroscopia si trova il tessuto sottocutaneo e gli strati muscolari sottostanti fortemente edematosi, e infiltrati di un liquido sanguinolento pieno di bollicine di gas. Ciò che colpisce è specialmente il color rosso-scuro, quasi nerastro, che ha la muscolatura tutto attorno al luogo del tumore. Negli organi interni nulla si trova di notevole.

Nel liquido dell'edema si trovano abbondanti i bacilli specifici della malattia, dei quali fu dimostrata l'importanza patogenica per opera dapprima di Arloing, Cornevin e Thomas, che coltivarono i bacilli nei mezzi liquidi, e più tardi per opera di Kitasato (2), il quale è riuscito per primo a coltivarli isolati nei mezzi solidi di nutrizione, riproducendo negli animali la malattia coll'innesto di culture indubbiamente pure.

Questi bacilli sono lunghi da 3 a 6 μ, piuttosto grossi (0,5-0,7 μ) e si trovano per lo più isolati, o riuniti a due, ma non sotto forma di filamenti più lunghi. Si riscontrano in essi facilmente forme strane, involutive, foggiate a mo' di fuso o di navicella, o a bacchetta da tamburo, tanto nell'organismo animale che nelle culture. Sono sporigeni, e la spora ha sede vicino ad una delle estremità del bacillo, assumendo questo una forma fusata. Le spore si formano facilmente nelle culture e nell' organismo animale, ma in questo soltanto dopo la morte (Kitasato).

È un perfetto anaerobio, e si sviluppa nei mezzi ordinarî di nutrizione, lungi dall'O, anche alla temperatura dell'ambiente (16-20° C.), ma più rigogliosamente a 36-38° C. Fluidifica la gelatina, e si sviluppa in questa, come nell'agar e nel brodo, producendo in abbondanza gas, aventi un odore leggero di burro rancido.

È mobile e provvisto di ciglia numerose, come il bacillo dell'edema maligno. Al pari di questo perde rapidamente la sua mobilità nelle goccie pendenti, in causa dell'O atmosferico.

Non si colora col metodo Gram, e si colora invece facilmente colle soluzioni ordinarie dei colori d'anilina.

La malattia si riproduce facilmente, inoculando sotto la cute di un animale sensibile sia la sostanza del tumore specifico e sia la cultura dei bacilli. L'animale più adatto per tale esperienza è la cavia, in cui si riproducono gli stessi fenomeni morbosi già descritti

(2) Kitasato, *Ueber das Wachsthum des Rauschbrandbacillus in festen Nährsubstraten*, Zeitschr. f. Hygiene Vol. 8, 1890, pag. 55.

pel vitello. Il reperto dei bacilli nell'interno degli animali infetti è diverso a seconda del tempo trascorso dalla morte. Appena dopo la morte, si trovano i bacilli senza spore e localizzati soltanto nel luogo dell'innesto; qualche tempo (24-48 ore) dopo invece i bacilli si fanno sporigeni, e si trovano anche negli organi interni.

I topi bianchi sono poco recettivi per questa infezione: i conigli poi, come anche i ratti, i cani, i polli, ecc., ne sono quasi immuni. Nell'uomo non si è finora verificato nessun caso di tale malattia.

È interessante il fatto, osservato da Roger (1), che inoculando nei conigli, i quali sono naturalmente immuni pel virus del carbonchio sintomatico, lo stesso virus mescolato con acido lattico, oppure con culture, sterilizzate o no, di proteo volgare e di micrococco prodigioso, si produce in essi l'infezione e la morte.

Questo fatto si collega coll'altro, osservato da Arloing, Cornevin e Thomas, che mescolando lo stesso virus, artificialmente attenuato per mezzo del calore, con una soluzione di acido lattico al 20 %, e inoculandolo negli animali, si ottiene la morte di questi e il ripristinarsi della virulenza del bacillo attenuato.

Tutto ciò si può spiegare per l'azione nociva che esercita l'acido lattico, del pari che i prodotti del micrococco prodigioso e del proteo volgare, nell'organismo animale, rendendolo così meno resistente all'azione patogena di quel microrganismo.

L'attenuazione del bacillo del carbonchio sintomatico si verifica naturalmente nelle culture in brodo, mentre quelle nei mezzi solidi si mantengono lungamente virulente (Kitasato). Si può anche facilmente produrne l'attenuazione artificiale, sia coltivandolo a 42-43° C., e sia esponendo per qualche ora il virus contenente spore al calore secco fra 80 e 90° C., oppure al calore umido a 100° C, come ha proposto Kitt (2); il quale si è servito appunto della carne muscolare di animali infetti, tenuta nel vapor d'acqua a 100° per 6 ore e poscia disseccata, per prepararne una sostanza vaccinante, che iniettata una sola volta negli animali (vitelli, pecore e cavie) conferisce loro l'immunità pel virus forte.

L'immunità pel carbonchio sintomatico si può produrre anche mediante l'iniezione dei prodotti solubili delle culture (Roux (3)), oppure coll'innesto delle culture attive, fatto in località dove il virus non può attecchire, come è il sangue, o il tessuto sottocutaneo compatto alla base della coda.

(1) Roger, *Inoculation du charbon symptomatique au lapin*, Comptes rend. soc. de biologie 1889.

(2) Kitt, *Versuche über einmalige Rauschbrand-Schutzimpfung*, Iahresber. der Thierarzneischule in München, 1886-87.

(3) Roux, *Immunité contre le charbon symptomatique conférée par des substances solubles*, Annales de l'Institut Pasteur, 1888, pag. 48.

L'applicazione pratica delle vaccinazioni preventive col virus attenuato nel bestiame bovino ha dato dappertutto eccellenti risultati.

4. Bacillo del tetano.

(*Bacillo di Nicolayer, B. spilliforme, ecc.*).

La natura infettiva del tetano traumatico è stata la prima volta dimostrata da Carle e Rattone (1), i quali riuscirono a riprodurre la malattia negli animali mediante l'innesto di materiale preso dall'uomo malato.

Quasi contemporaneamente Nicolayer (2) trovò che l'innesto della terra di giardino produce nei topi, nelle cavie, e nei conigli una malattia simile affatto al tetano dell'uomo, e che nel pus del luogo d'innesto negli animali inoculati si osserva costantemente, misto ad altre forme di microrganismi, un bacillo speciale, lungo e sottile, foggiato a mo' di spillo, vale a dire con una spora terminale, più grossa del corpo del bacillo.

Rosenbach (3) ha per primo osservato lo stesso bacillo in un caso di tetano dell'uomo, ed ha riprodotto anche la malattia negli animali coll'innesto del materiale impuro contenente il bacillo. — E questo il microrganismo che fu più tardi dimostrato come sicuramente specifico delle forme di tetano che si osservano nell'uomo (*tetanus traumaticus, tetanus neonatorum*), giacchè non solo la sua presenza si è trovata costante nei casi di tale malattia, ma si è anche potuto coll'innesto delle culture pure di esso riprodurre negli animali il quadro tipico del male.

Sarebbe troppo lungo, ed anche poco concludente, lo esporre qui tutte le fasi per cui è passato lo studio dell'eziologia del tetano, prima che si riuscisse ad ottenere in cultura pura il bacillo di Nicolayer, ed a produrre coll'innesto di esso la prova indiscutibile del suo valore specifico. Basti il ricordare che in addietro l'avere osservato quasi costantemente negli animali infetti questo bacillo insieme ad altre forme bacillari, dalle quali non era possibile isolarlo, avea condotto ad ammettere l'esistenza di una specie di simbiosi fra questi diversi microrganismi, necessaria pel loro sviluppo e pel prodursi dell'infezione.

(1) Carle e Rattone, *Studio sperimentale sull'eziologia del tetano*, Giornale della R. Accademia di medicina di Torino. N.° 3. 1884.

(2) Nicolayer, *Ueber infectiösen Tetanus*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 52, 1884.

(3) Rosenbach, *Zur Aetiologie des Wundstarrkrampfes beim Menschen*, Archiv. f. klin. Chirurgie 1886, p. 306.

In seguito invece si è riconosciuto, per mezzo dell'innesto delle culture pure, che il bacillo veramente specifico è uno solo, e che basta di per sè a produrre la malattia. Si è però in pari tempo osservato, come meglio si dirà fra poco, che, lungi dall'essere indifferente, la presenza degli altri microrganismi giova assai per lo sviluppo del bacillo specifico, e quindi anche per l'infezione che esso produce.

Le culture pure di questo microrganismo, il quale, secondo la maggior parte degli osservatori, è strettamente *anaerobio*, sono state ottenute, quasi contemporaneamente, da Kitasato (1) riscaldando le culture impure a 80° C. per circa un'ora, e da Tizzoni e Cattani (2) facendo semplicemente le culture isolanti in un'atmosfera di idrogeno. Il metodo del riscaldamento, per la sua semplicità e per la sicurezza della riuscita, è da preferirsi; bisogna soltanto avere l'avvertenza di sottoporre a 80° C. ($^3/_4$-1 ora in bagnomaria) le culture, poco dopo oltrepassate le 30 ore di sviluppo a 37° C., il qual tempo è necessario perchè si formino le spore del bacillo del tetano, senza che sia ancora avvenuta la sporificazione degli altri bacilli.

Il bacillo del tetano è mobile, e provvisto, secondo Schwarz (3), di un unico filamento ciliare, situato ad una delle estremità del bacillo, o in prossimità di essa. In contatto dell'O perde ben presto la sua mobilità.

Nelle culture giovani e nel pus dei tetanici si presenta sotto forma di bastoncini piuttosto lunghi e sottili, isolati o riuniti in filamenti anche lunghi. In uno stadio più avanzato di sviluppo nelle culture, talvolta anche nel pus, il bacillo diventa sporigeno, ed assume allora l'aspetto di bacchetta di tamburo, o di spillo: è lungo da 3-5 μ, e ad una delle estremità è provvisto di una spora brillante, per lo più rotonda, o leggermente ovale, 2-4 volte più larga del corpo bacillare. I bacilli sporigeni sono immobili. Le spore si formano nelle culture più o meno rapidamente, a seconda della temperatura di sviluppo; a 37° C. bastano, come si è detto, 30 ore, a 20-25° C. invece è necessaria una settimana, prima che compaiano le spore.

Secondo Belfanti (4), il bacillo del tetano sarebbe anaerobio fa-

(1) Kitasato, *Ueber den Tetanusbacillus*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. VII, 1889, p. 225.

(2) Tizzoni e Cattani, *Ricerche batteriologiche sul tetano*, Riforma medica 86, 1889.

(3) Schwarz, *Di un carattere morfologico del bacillo del tetano*, Lo Sperimentale N.° 18, 1891, p. 373.

(4) Belfanti, *Sulla morfologia del bacillo del tetano*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. 16, 1892, pag. 373.

coltativo, e sviluppandosi a contatto dell'aria si presenterebbe sotto forme diverse di cocco, di bacillo e di filamento, compiendo un ciclo di sviluppo analogo a quello dei microrganismi del genere *streptotrix*: esso diverrebbe anaerobio assoluto, allorquando si fa crescere per un certo tempo lungi dal contatto dell'aria.

Lo sviluppo del bacillo avviene fra 16° e 43° C.; la temperatura ottima è però di 35°-37° C.

Il bacillo si colora bene cogli ordinarî colori d'anilina, specialmente colla fucsina, e si colora anche col metodo di Gram. Le spore giovani si ottengono anch'esse colorate in un coi bacilli, coi metodi ordinarî di colorazione.

Le spore di questo bacillo sono abbastanza resistenti al calore e all'azione dei disinfettanti chimici. Esse infatti resistono prima di morire per più di sei ore ad una temperatura di 80° C., per una o due ore a 90°, per $^1/_4$ d'ora a 100° e per 5 minuti a 115° C. Resistono poco invece all'azione della luce, specialmente se a contatto dell'O atmosferico, come hanno stabilito Tizzoni e Cattani (1), e Vaillard e Vincent (2).

Nella gelatina l'aspetto delle piccole colonie nelle culture piane è abbastanza caratteristico: esse non sono visibili che dopo il 2°-3° giorno, ed appaiono sotto forma di una macchia granulosa centrale, circondata da un'aureola di raggi finissimi, simili a quelli di una colonia giovane di ifomiceto, ed a quelli delle colonie del *B. mesentericus vulgatus*. — Nelle culture fatte per infissione nella gelatina contenente glucosio, o solfoindigotato di soda, e disposta in alti strati, oppure nella gelatina ordinaria privata dall'O coi metodi di cultura anaerobica, lo sviluppo si fa manifesto dopo 3-5 giorni, sotto forma di filamenti, o strie bianco-grigiastre, irradiantisi in direzione perpendicolare alla linea d'innesto, tutto attorno alla stessa. La gelatina si liquefa lentamente con sviluppo di gas; ed allora i bacilli precipitano in fondo a mo' di fiocchi biancastri, restando però opaca tutta quanta la gelatina.

Nell'agar lo sviluppo è simile affatto a quello delle culture in gelatina nel primo stadio; manca naturalmente lo stadio ulteriore della fluidificazione, e si ha molto abbondante lo sviluppo di gas.

Cresce bene nel siero di sangue, tanto liquido che solidificato. Nel siero di sangue liquido, secondo le osservazioni di Tizzoni e

(1) Tizzoni e Cattani, *Ueber die Widerstandsfähigkeit der Tetanusbacillen gegen physikalische und chemische Einwirkungen*, Archiv. f. exper, Pathol. u. Pharmak. Vol. 28, p. 59.

(2) Vaillard et Vincent, *Contribution à l'étude du tétanos*, Annales de l'Intut Pasteur, N°. 1, 1891.

compagni (1), si sviluppa solidificando dapprima e successivamente disciogliendo il siero coagulato: nel siero di sangue solidificato, secondo Kitasato (2), il bacillo si sviluppa senza fluidificarlo, e secondo Tizzoni invece, fluidificandolo, o no, a seconda del grado di virulenza maggiore o minore che esso possiede. Cresce bene anche nel brodo, specialmente a 37° C., e con abbondante sviluppo di gas.

Cresce anche sulla superficie delle patate sotto forma di strato umido, lucente, simile a quello che vi forma il bacillo del tifo.

L'odore che emanano le culture del bacillo tetanigeno è assai disgustoso, e ricorda quello del corno bruciato.

La reazione del mezzo in cui si sviluppa il bacillo virulento, si fa sempre distintamente alcalina.

Il bacillo del tetano, artificialmente coltivato, va soggetto all'attenuazione, la quale, secondo Tizzoni e compagni, si fa rapidamente nelle culture fatte nel brodo e nell'agar, e più lentamente invece in quelle nella gelatina e nel siero. Sono interessanti i cambiamenti delle proprietà biologiche constatati da Tizzoni e Cattani (3) nel bacillo tetanigeno attenuato, in confronto di quello virulento. Le culture del bacillo attenuato si sviluppano anzitutto più rapidamente (entro le 24 ore, invece che dopo 2-3 giorni), non fluidificano più la gelatina, non hanno alcun odore e presentano una reazione spiccatamente acida. Oltre a ciò il bacillo ha perduto anche il potere di fluidificare il siero di sangue solidificato. Questo fatto, come anche l'altro del non fluidificare la gelatina, dimostra il nesso intimo che esiste fra la produzione del fermento peptico e quella della sostanza tossica del bacillo tetanigeno, la quale, come si dirà, ha molte delle proprietà dei fermenti organici.

Corrispondentemente a ciò l'esame microscopico dimostra chiaramente un processo di degenerazione (colorazione incompleta, alveolizzazione) nei bacilli attenuati, i quali in uno stadio di avanzata attenuazione, perdono anche la proprietà di produrre le spore.

Gli animali, sui quali il bacillo del tetano spiega la sua azione patogena, sono abbastanza numerosi. Annoveriamo fra questi il topo, la cavia, il coniglio, l'agnello, l'asino, il cavallo, ecc.

Allorquando in un animale sensibile si fa l'innesto sottocutaneo di materiale tetanigeno, i primi fenomeni di malattia si madifestano dopo 24-48 ore, sotto forma di contrattura permanente nelle parti dove si è fatto l'innesto (in generale uno degli arti posteriori); a poco a poco i fenomeni tetanici si generalizzano, e la morte dell'animale avviene dopo un certo periodo di tempo, diverso (4-10 giorni) secondo la quantità e il grado di virulenza del materiale inoculato.

(1) Tizzoni, Cattani e Baquis. *Bacteriologische Untersuchungen über den Tetanus*, Ziegler's Beiträge zur path. Anatomie, Vol. 7.° p. 569.

(2) Kitasato, *Experimentelle Untersuchungen über das Tetanusgift*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 10, 1891, p. 305.

(3) Tizzoni e Cattani, *Sull'attenuazione del bacillo del tetano*, Riforma medica, 1891, N.° 89.

Il reperto necroscopico è alquanto diverso, a seconda che si è adoperato per l'innesto un materiale impuro (polvere, terra, pus, ecc.), oppure le culture pure del microrganismo specifico. Nel primo caso, che è quello che si verifica nell'infezione naturale dell'uomo, si trova nel luogo di innesto un essudato purulento, o membranoso e denso, nel quale si osservano commisti ad altri microrganismi, generalmente però in piccol numero, i bacilli del tetano, provvisti di spore: nel caso d'innesto con culture pure invece non si trova pus, ed i bacilli specifici sono poco numerosi e sprovvisti di spore. Talvolta anzi succede di non poter dimostrare coll' esame microscopico la presenza di bacilli nel luogo d' innesto; ciò si verifica specialmente allorquando si iniettano le spore, e si spiega pel fatto, che l'animale in tal caso muore per opera delle sostanze tossiche introdotte insieme con quelle, senza che sia avvenuta la loro germinazione nell'organismo, mentre le spore introdotte vengono rapidamente eliminate dal luogo d' innesto per mezzo dei leucociti.

Questo fatto è stato dimostrato da Vincent, Vaillard e Rouget (1), i quali hanno potuto constatare che le spore del bacillo tetanigeno, riscaldate per 3 ore alla temperatura di 80° C., la quale distrugge quasi completamente il veleno che è ad esso aderente, senza modificare la vitalità e neppure lavi rulenza dei bacilli che se ne sviluppano, si possono inpunemente iniettare negli animali, purchè in dosi non troppo forti; mentre invece le stesse spore, se vengono introdotte miste ad acido lattico od alle culture di altri microrganismi (micrococco prodigioso, ecc.), producono l'infezione, sviluppandosi sotto forma di bacilli nell'organismo animale.

I bacilli del tetano, durante l'infezione, non si diffondono al di là del luogo d' innesto. Negli organi interni non si trovano bacilli, e non si nota neppure alterazione patologica alcuna, manifesta.

Nell'uomo l'infezione ha luogo in seguito a penetrazione dell'agente specifico attraverso le soluzioni di continuo della pelle, sia per infissione nei tessuti di un corpo estraneo sporco di polvere, o di terra, ecc., e sia per inquinamento delle ferite o piaghe, come si è dimostrato pel tetano dei neonati, in cui Beumer (2) e Peiper (3) hanno dimostrato la presenza del bacillo specifico nel pus della ferita ombellicale.

(1) Vaillard et Rouget, *Contribution à l'étude du tètanos; étiologie.* Annales de l'Institut Pasteur, 1892, pag. 385.

(2) Beumer, *Zur Aetiologie des Trismus, sive Tetanus neonatorum*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. III, 1887, p. 242.

(3) Peiper, *Zur Aetiologie des Trismus, sive Tetanus neonatorum*, Centralbl. f. klin. Med. N.° 42, 1887.

Non è probabile che l'infezione avvenga anche per altre vie, ad es. per gli organi digerenti, come si è creduto da taluni; giacchè si è sperimentalmente dimostrato che le spore del bacillo tetanigeno passano attraverso il tubo digerente degli animali sensibili, senza produrre alcun fenomeno morboso, e conservando intatta la loro virulenza. Il trovarsi il bacillo del tetano, assai spesso, negli escrementi degli erbivori, e specialmente in quelli dei cavalli, ha condotto Verneuil (1) ad ammettere che il tetano si verifichi soltanto nelle persone, le quali, in una maniera o nell'altra, hanno a che fare coi cavalli (origine *equino-tellurica* del tetano).

Secondo Sormani (2) invece la diffusione del virus tetanigeno si farebbe per mezzo delle feci di qualsiasi animale (erbivori e carnivori), giacchè le spore del bacillo, introdotte in essi cogli alimenti, giusta le sue osservazioni, si moltiplicano attivamente nel tubo intestinale, senza attenuarsi, e vengono così sparse abbondantemente colle feci nel mondo esterno (*teoria fecale* del tetano).

La maniera con cui il bacillo del tetano riesce patogeno è ormai sicuramente conosciuta. Allorquando attraverso una soluzione di continuo della pelle esso penetra nel nostro organismo, moltiplicandosi sul luogo, dà origine a sostanze velenose, le quali, assorbite e portate in circolo, localizzano la loro azione nel sistema nervoso centrale. In qualche caso, come si è detto, una quantità sufficiente di queste sostanze viene introdotta insieme ai microrganismi, ed allora la malattia si sviluppa senza che questi si moltiplichino sensibilmente.

È stato Brieger (3), il quale ha isolato per primo da culture impure del bacillo di Nicolayer e dalla carne muscolare di un arto di uomo morto di tetano, alcune sostanze basiche velenose, che egli ha chiamato tetanina, tetanossina e spasmotossina. Secondo Brieger e Fränkel (4), il principio attivo, estratto dalle culture pure del bacillo, sarebbe di natura albuminoide (tossi-albumina), mentre invece secondo Faber (5), e secondo anche gli studi accurati fatti sulle proprietà di questo veleno da Tizzoni e Cattani e da Vaillard e Vincent, esso apparterrebbe piuttosto ai fermenti organici.

Le culture sterilizzate mediante filtrazione, del pari che la

(1) Verneuil, *Études sur la nature, l'origine et la phatogénie du tétanos*, Révue de chirurgie, 1887 e 1888.

(2) Sormani, *Teoria fecale del tetano*, Annali dell' Istituto d' Igiene della R. Università di Roma, Vol. I, 1891, pag. 355.

(3) Brieger, *Untersuchungen über Ptomaïne*, 2.ª Ediz. 1886.

(4) Brieger u. Fränkel, *Untersuchungen über Bacteriengifte*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 11 e 12, 1890.

(5) Faber, *Die Pathogenese des Tetanus*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 31, 1890.

sostanza attiva, isolata da esse con opportuni processi, iniettate negli animali (topi, cavie, conigli), riproducono in questi il quadro clinico del tetano, uguale a quello che si ha coll'innesto del materiale contenente i bacilli. Secondo Kitasato, l'animale più sensibile pel veleno tetanigeno è la cavia; viene in seconda linea il topo, e in terza il coniglio.

Il liquido delle culture, filtrato ed evaporato nel vuoto, lascia un residuo bruno, virulentissimo. L'alcool non discioglie il principio attivo: questo è invece facilmente solubile nell'acqua, e dalle soluzioni acquose viene precipitato dall'alcool sotto forma di fiocchi grigiastri; esso viene anche trascinato insieme coi precipitati finamente granulosi di fosfato di calce e di alluminio, proprietà tutte che tale sostanza ha in comune coi fermenti solubili.

Il veleno tetanigeno è molto sensibile all'azione del calore: basta infatti la temperatura di 65° C. per distruggerlo in 5 minuti, ed anche meno. Resiste all'azione del disseccamento alla temperatura ordinaria dell'ambiente, mentre invece a 37° C. diventa presto inattivo. La luce solare lo distrugge egualmente, e assai più presto la luce solare diretta, che quella diffusa.

Un fatto molto importante è quello trovato da Behring e Kitasato (1), che, cioè, il siero di sangue dei conigli, resi artificialmente immuni verso il tetano, ha la proprietà di distruggere il veleno tetanigeno, sia *in vitro*, come nell'organismo degli animali infetti. Kitasato ha inoltre osservato che il siero di animali, naturalmente immuni per la malattia, quello del pollo ad es., non possiede affatto una tale proprietà antitossica. Basta però di introdurre nell'organismo del pollo una forte dose di veleno tetanigeno, perchè il siero del sangue, fornito da esso, manifesti, trascorso un certo tempo (14 giorni circa), un forte potere antitossico.

Di quel fatto si son valsi gli osservatori ora nominati per conferire agli animali l'immunità contro l'infezione del tetano, come anche per impedire lo sviluppo di essa negli animali già inoculati col virus attivo (topi), mediante l'iniezione di siero sanguigno preso da animali resi immuni artificialmente (2).

Tizzoni e Cattani (3) hanno confermato ed ampliato i dati di Behring e Kitasato, non solo, ma hanno anche estratto dal siero sanguigno dei cani e dei conigli, vaccinati pel tetano, una sostanza albuminoide analoga alle globuline, che precipita coll'alcool

(1) Behring u. Kitasato, *Ueber das Zustandekommen der Diphterie-Immunität u. Tetanus-Immunität*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 49, 1890.

(2) Behring, *Die Blutserumtherapie*, Leipzig, 1892. — Kitasato, *Heilversuchen an Tetanuskranken Thieren*. Zeitschr. f. Hygiene, Vol. XII, 1892, p. 256.

(3) Riforma medica, N.° 10, 102, 126, 183 e 184, 1891. N. 192 e 193, 1892.

e col solfato di magnesia, e che ha precisamente lo stesso potere del siero, distruttore pel veleno tetanigeno, ed immunizzante per gli animali. Un tale principio è stato perciò da essi chiamato « antitossina del tetano », e si trova nel sangue, prevalentemente nel siero, e manca invece nei tessuti (nervoso e muscolare) e negli organi interni (milza, fegato, rene).

Riguardo all'applicazione di questa sostanza per la cura del tetano nell'uomo, per quanto siasi già tentata in un numero considerevole di casi, non si è ancora giunti a pronunciare sulla sua efficacia un giudizio sicuro e definitivo. Non entriamo sui particolari di tale questione, perchè ciò uscirebbe dai limiti impostici dalla natura tecnica del libro; ricordiamo soltanto il fatto, su cui insistono giustamente Roux e Vaillard (1), che piccole dosi di antitossina, contenuta nel siero sanguigno di animali immunizzati, servono sicuramente a prevenire lo sviluppo del tetano, mentre grandi dosi della stessa sostanza possono riuscire inefficaci ad arrestare il corso del male, già sviluppato. Tutte le volte quindi che, per la natura della ferita, si ha timore che il tetano si sviluppi, si applichi piuttosto la cura preventiva mediante le iniezioni dell' antitossina: allorquando poi la malattia è sviluppata, non bisogna mai trascurare anche la cura locale della ferita, per distruggere il focolaio di produzione del veleno tetanigeno, in pari tempo che si cerca di rendere innocuo coll'antitossina il veleno già esistente nell' organismo.

Il siero antitossico per la cura dell'uomo si ottiene facilmente e in grande copia dal cavallo, reso immune artificialmente contro l'infezione.

I metodi usati dai diversi sperimentatori per rendere immuni gli animali, a fine di ricavare da essi il siero antitossico, sono di diversa natura. Roux e Vaillard adoperano per tale scopo culture di bacillo del tetano in brodo peptonizzato, di 4-5 settimane di età, filtrate e mescolate in proporzione variabile colla soluzione jodo-jodurata di Gram. Lo jodo toglie in gran parte alla tossina del tetano le sue proprietà nocive, senza toglierle nulla del suo potere immunizzante. — L'attività immunizzante del siero sanguigno degli animali, così trattati, si misura, come ha proposto Behring, secondo la quantità del siero che è necessaria per rendere immune 1 gr. di topo. Così, quando si dice che un siero ha l'attività immunizzante di 1 milione, ciò vuol dire che 1 cc. di esso serve a rendere immune 1000 Kgr. di topo, ovverosia che un topo di 30 gr. si può rendere refrattario coll'iniezione di cc. 0.00003 di quel siero.

(1) Roux et Vaillard, *Contribution à l'étude du tétanos*, Annales de l'Institut Pasteur, T. VII, 1893, pag. 65.

Per conservare il siero antitossico, Roux e Vaillard usano disseccarlo nel vuoto, giacchè l'antitossina, disseccata e conservata al riparo dalla luce, si conserva attiva indefinitamente. Per adoperarla, basta discioglierla in sei volte il suo peso di acqua distillata e sterilizzata. Il siero antitossico del cavallo si può iniettare nell'uomo affetto da tetano a dosi molto grandi (100-400 cc.) senza produrre alcun danno.

Il bacillo del tetano si trova estremamente diffuso in natura. Lo si è trovato abbondante nelle terre coltivate e concimate, nella polvere delle strade ed in quella delle abitazioni; e difatti l'abitudine che ha il volgo di arrestare l'emorragia delle ferite, coprendole di ragnatele, è stata non poche volte causa di infezione tetanica. Lo si è pure trovato nel calcinaccio delle costruzioni antiche (1) e nel riempiticcio dei soffitti delle case (2).

L'essere i casi di tetano relativamente rari, almeno nelle zone temperate, in confronto della grande diffusione dell'agente specifico, si può spiegare sia pel fatto che esso non sempre si trova dotato di tutta la sua virulenza, e sia per ciò che è necessario che esso penetri profondamente nei tessuti, perchè si possa sviluppare lungi dal contatto dell'ossigeno libero e produrre l'infezione.

5. Bacillo della tubercolosi.

La natura infettiva della tubercolosi era stata già da tempo stabilita dallo studio dell'anatomia patologica e dal modo di decorrere dell'infezione tubercolare, e specialmente poi dai risultati degli innesti, fatti anzitutto da Villemin, e ripetuti poscia da Biffi e da Verga (3), da Mantegazza e da Armanni (4) in Italia, e da Baumgarten, da Tappeiner e da altri in Germania (5), i quali stabilirono in maniera positiva la trasmissibilità della tubercolosi dall'uomo agli animali, e quindi il posto della stessa fra le malat-

(1) Bonome, *Ueber die Aetiologie des Tetanus*, Fortschr. d. Med. Vol. V, 1887 pag. 690.

(2) Heinzelmann, *Ueber die Verbreitung des Tetanuserregers in Fehlbodenfüllungen Münchener Häuser*, Münch. med. Woch. N.° 37 e 38, 1891.

(3) Verga e Biffi, *Sulla inoculabilità della tubercolosi*, Rendiconti del R. Istituto Lombardo, 1867 seduta del 25 luglio, e 1868 seduta del 26 novembre.

(4) Armanni, *Sulla specificità e virulenza delle sostanze caseose e tubercolose*. Il Movimento medico-chirurgico, Napoli 1872, N.° 30, 31 e 32.

(5) Qui mi piace di far rilevare una inesattezza, in cui sono caduti gli scrittori tedeschi (non escluso Koch) nel delineare la storia della scoperta dell'eziologia della tubercolosi. Oltre che da nessuno si fa menzione dei lavori italiani suaccennati, i quali hanno preceduto quelli tedeschi (parlo di quelli che ottennero risultati positivi), si pone in prima linea il nome di Cohnheim fra quelli che hanno dimostrato la natura infettiva, specifica, del virus tubercolare. Cohnheim invece nel suo primo lavoro, pubblicato sull'argomento insieme con Fränkel (Virchow's Archiv., Bd. 45, 1869, p. 216), ha concluso col negare la dottrina del Villemin, ed in seguito ha mostrato di accettarla, solamente quando la specificità del tubercolo era già stata luminosamente posta in sodo da molti e seri sperimentatori.

tie da infezione. Mancava tuttavia di determinare la natura del contagio, per quanto alcuni avessero anche descritto varie forme di microrganismi, quali agenti specifici della malattia (Klebs, Schüller, Toussaint).

Nel 1882, quasi contemporaneamente, Koch (1) e Baumgarten (2), il primo valendosi di un processo speciale di colorazione, il secondo invece giovandosi dell'azione dissolvente degli alcali, descrissero nei tessuti tubercolari una forma speciale di bacillo, diversa da tutte le altre antecedentemente osservate. Spetta però a Koch il merito di avere dimostrato la natura parassitaria della tubercolosi col metodo scientifico più rigoroso e con esperienze numerosissime, le quali, ripetute, ebbero da ogni dove una splendida conferma. Koch infatti ha provato che la causa unica di tutte le varie forme di tubercolosi (tubercolosi miliare, tisi polmonare o intestinale, scrofolosi delle ghiandole, tubercolosi locale degli organi, lupus, artrite fungosa) è uno speciale bacillo, che si differenzia dagli altri pel suo modo speciale di comportarsi di fronte ai colori d'anilina, e che, sviluppandosi nei tessuti, dà origine al processo morboso tubercolare, sia nell'uomo come negli animali (buoi, cavalli, pecore, scimmie, majali, cani, gatti, conigli, cavie, ecc.).

Egli è inoltre riuscito a coltivare questo bacillo al di fuori dell'organismo animale, dimostrando l'identità di esso in tutte le varie forme di tubercolosi dell'uomo e dei mammiferi, ed ha riprodotto la malattia coi suoi caratteri speciali, mediante l'innesto delle culture pure, di qualsivoglia generazione. Egli ha infine cercato di completare eziandio i suoi studî colla cura della malattia già in corso, mediante l'iniezione delle sostanze estratte dalle culture dei bacilli (*tubercolina*); e se i suoi tentativi non sono stati finora coronati da quel successo che se ne sperava, è probabile che, proseguendo nella via da lui aperta, si riesca, modificando e perfezionando il metodo, a combattere finalmente la terribile malattia.

Si attribuisce inoltre a Cohnheim il merito di avere per primo fatto gli esperimenti in modo (innesto nella camera anteriore dell'occhio) da escludere l'influenza perturbatrice del processo infiammatorio concomitante, e di aver dimostrato nella tubercolosi da innesto un periodo d'incubazione (Cohnheim e Salomonsen, *Ueber künstl. Tuberc.*, a. d. Sitz.-ber. d. schles. Ges., 1877). Ma la dimostrazione di questo fatto era stata già data molto tempo prima, nel 1872, da Armanni (lavoro citato), il quale avea inoltre operato gl'innesti in una località (*cornea*), ove la purezza dell'esperimento non poteva essere menomamente turbata dal processo infiammatorio; col vantaggio anzi sul metodo di Cohnheim, che invece di introdurre pezzi di materiale tubercolare, introduceva quantità piccolissime di virus (ago bagnato nelle masse caseose), producendo in tal guisa uno degli argomenti più validi in appoggio della teoria dell'infettività della malattia.

(1) Koch, *Die Aetiologie der Tuberculose*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 15, 10 aprile 1882, e Mittheil, a. d. kais. Gesundheitsamt, Vol. II, 1884.

(2) Baumgarten, *Tuberkelbakterien*. Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1882, N.° 15, p. 257 e N.° 19, p. 337.

I bacilli della tubercolosi dei mammiferi sono lunghi da 1,5 a 3 μ, piuttosto sottili, ad estremità arrotondate, non perfettamente diritti, ma per lo più ondulati, ed isolati, raramente riuniti in filamenti, composti da due fino a 6 membri. Allorquando si sviluppano liberamente, nelle culture e negli sputi, si aggregano a fascetti, composti da un numero vario di bacilli (Tav. V, fig. 10).

Colorati coi metodi già esposti, lasciano apparire nel loro protoplasma la presenza di spazî chiari, i quali da alcuni vengono interpretati come spore. Questi spazî chiari però, sia pel loro numero (più di uno per ogni bacillo) e sia per la loro forma irregolare e mal definita, hanno piuttosto l'apparenza di semplici vacuoli che di vere spore. Oltre a ciò, non essendosi ancora dimostrato nei bacilli presunti sporigeni un grado maggiore di resistenza che in condizioni diverse, giacchè i bacilli di qualunque provenienza e a qualsiasi grado di sviluppo muoiono sempre ad un grado di temperatura non molto alto (60-70° C.), e non essendo neppure stato osservato uno stato libero di quelle spore, e tanto meno la loro germinazione, non possiamo dirci autorizzati finora ad ammettere in questi bacilli una fase di vera fruttificazione.

Il bacillo della tubercolosi è affatto sprovvisto di movimenti proprî.

Esso è anaerobio facoltativo, e al di fuori dell'organismo animale si sviluppa con molta difficoltà. Cresce bene difatti soltanto in certi mezzi di nutrizione, ed entro limiti di temperatura abbastanza ristretti. Questi limiti sono compresi fra 30 e 41° C.; ma il grado ottimo di temperatura è di 37° C., e bastano leggere oscillazioni da questo grado per rendere il suo sviluppo assai magro e stentato.

I mezzi di nutrizione migliori per la coltivazione del bacillo della tubercolosi sono: il siero di sangue solidificato (di cavallo, di vitello, di agnello), semplice o coll'aggiunta del 6-8 % di glicerina (Roux e Nocard), e l'agar ed il brodo, glicerinati egualmente. Sull'agar e nel brodo semplice non cresce che assai stentatamente. Pawlowski (1) è riuscito anche ad ottenerne lo sviluppo sulla superficie delle patate, preparate col metodo di Roux, saldando i tubi alla lampada, per impedire l'evaporazione dell'acqua, e Sander (2) ha anche osservato che i bacilli tubercolari si sviluppano sulle patate, qualunque sia la loro reazione (meglio però quando è leggermente

(1) Pawlowsky, *Cultures des bacilles de la tuberculose sur la pomme de terre*, Annales de l'Institut Pasteur, 1888, pag. 303.

(2) Sander, *Ueber das Wachsthum von Tuberkelbacillen auf pflanzlichen Nährboden*, Archiv f. Hygiene, Vol. 16, 1893, pag. 238.

acida), purchè le patate si mantengano sempre umide e vi sia abbondante l'O libero; egli ha trovato inoltre che questi bacilli si sviluppano anche in altre sostanze nutritive vegetali, e che l'estratto acquoso semplice di patate (senza peptone), neutralizzato e glicerinato, serve assai bene per la loro coltivazione. Secondo Martin (1) poi un eccellente mezzo di nutrizione pel bacillo della tubercolosi è il brodo preparato colla carne di certi pesci, specialmente delle aringhe, oppure l'agar preparata collo stesso brodo.

Per ottenere dai prodotti tubercolari la cultura pura del bacillo specifico, si possono fare le culture isolanti coll'agar glicerinata, ma val meglio purificare prima il materiale mediante l'innesto negli animali, e prender poscia da questi il materiale puro per le culture. Il mezzo più spiccio si è di inoculare sottocute ad una cavia, nella parte interna della coscia, una piccola quantità di prodotto patologico (sputo, sostanza caseosa, ecc.), estrarre le ghiandole inguinali corrispondenti, appena abbiano raggiunto la grossezza di un acino di pepe, o poco più, allorquando, cioè, è appena incominciata la caseificazione nel loro interno, prendere coll'ansa di platino un po' di sostanza caseosa, e strisciarla accuratamente sulla superficie del siero o dell'agar, preparati nella maniera anzidetta.

Se si vuole invece ottenere la cultura dai nodi tubercolari recenti (tubercoli grigi), è necessario dapprima schiacciarli fra le lame di due bistorì sterilizzati, e strisciarli poscia con un ago di platino robusto sulla superficie del mezzo di nutrizione.

Per coltivare i bacilli contenuti negli sputi dei tisici, Kitasato (2) ha applicato con vantaggio un metodo, già usato da Koch per lo stesso scopo, e che consiste nel raccogliere direttamente, entro scatole di vetro sterilizzate, lo sputo che i malati emettono al mattino dietro i colpi di tosse, nel prenderne una piccola porzione con istromenti sterilizzati, e lavarla successivamente in una serie di scatole di vetro (10 almeno), contenenti acqua sterilizzata, per eliminare i batterî che si mescolano collo sputo, durante il suo passaggio nella bocca. Fatto ciò, si dilacera il pezzo di sputo, tenendolo sempre nell'acqua, e se ne prende dal mezzo una piccola parte, che si distribuisce coll'ago di platino sulla superficie dell'agar o del siero sanguigno. Questo metodo offre il vantaggio di poter coltivare anche gli altri microrganismi, che si trovano nel secreto bronchiale in un coi bacilli tubercolari, e che possono avere anch'essi importanza nel processo tisiogeno polmonare. In tal modo

(1) Martin, *Sur la culture du bacille de la tuberculose*, Archives de méd. expér. 1889, pag. 77.

(2) Kitasato, *Gewinnung von Reinculturen der Tuberkelbacillen und anderer pathogener Bacterien aus Sputum*, Zeitschr. f. Hygiene. Vol. XI, pag. 441, 1892.

infatti Kitasato, ed anche Cornet, hanno constatato la presenza frequente di streptococchi nel contenuto delle caverne dei tisici; e questo reperto è stato confermato ed ampliato dalle ricerche di Petruschky (1), fatte nei cadaveri, dalle quali è risultato che l'infezione da streptococchi costituisce la complicazione più frequente della tubercolosi polmonare.

Nel fare le culture dei bacilli tubercolari, non bisogna trascurare alcune piccole avvertenze per la preparazione dei tubi nei quali si fa l'innesto. Così, dopo avere introdotto il materiale, prima di rimettere a posto il turacciolo di cotone, bisogna bruciarlo rapidamente sulla fiamma, e tagliarne poscia colle forbici la parte sporgente dal tubo, bruciando di nuovo sulla fiamma l'estremità del tubo rinchiuso, ed umettando la superficie libera del cotone con una goccia di sublimato. I tubi si chiudono infine con una calotta di gomma, o con altro mezzo, per impedire l'evaporazione e il disseccamento del mezzo di cultura, e si tengono a 37° C. Si deve finalmente fare l'innesto in un numero considerevole di tubi (10-15), perchè di questi alcuni vanno ordinariamente perduti in causa di impurità accidentali, che si fanno strada durante l'operazione.

Tutte queste cautele sono necessarie, perchè lo sviluppo del bacillo tubercolare, specialmente quando lo si coltiva la prima volta, dai prodotti patologici è molto lento, ed appare visibile sui mezzi di nutrizione soltanto due settimane circa dopo fatto l'innesto.

L'aspetto della cultura nel siero di sangue semplice e nei mezzi glicerinati è alquanto diverso. Nel siero semplice la colonia appare sotto forma di straterello grigiastro, secco, non lucente, come composto da un ammasso di scagliette, che si distaccano facilmente dal siero sottostante: questo strato secco si estende, a poco a poco, anche sulla superficie del liquido raccolto in fondo al tubo, senza penetrare nell'interno del liquido e senza intorbidarlo. Sull'agar e sul siero glicerinati, invece, lo sviluppo è più rapido e più rigoglioso. Esso è visibile già nella prima settimana, e dopo 15 giorni, se si è avuto cura di sparpagliare il materiale d'innesto largamente sulla superficie del mezzo, questa appare tutta coperta da uno strato biancastro, lucente, irregolarmente spesso (Tav. III, fig. 3), il quale coll'andar del tempo diventa giallognolo, mentre nel siero semplice la colonia acquista il grado massimo di sviluppo soltanto dopo 4-5 settimane.

L'aspetto delle colonie giovani, isolate, del bacillo, osservate al microscopio con un debole ingrandimento (80 diam.), è caratteristico

(1) Petruschky, *Tuberkulose und Septicämie.* Deutsche med. Wochenschrift. N. 13. 1893.

ed elegante (Tav. III, fig. 5). Esse appaiono composte di piccoli ammassi lineari, sinuosi, incurvati a forma di S, o a mo' di serpente, intrecciantisi fra di loro, i quali nei preparati fatti per impressione (comprimendo un vetrino sulla colonia e distaccandolo rapidamente) appaiono composti da ammassi di bacilli, accollati gli uni agli altri in ordine regolare.

I bacilli tubercolari riprodotti nelle culture sono alquanto più corti di quelli contenuti nei prodotti patologici; essi mantengono inalterata la loro virulenza per un numero di generazioni, che, giusta l'esperienza fatta finora nel laboratorio di Koch, in cui si coltiva tuttora, ed è attivo, il bacillo ottenuto da esso la prima volta, si può dire indefinito. Se però non si trapianta, invecchiando nelle culture, a poco a poco si altera e muore (6-7 mesi).

I metodi di colorazione di questi bacilli sono uguali, sia per quelli delle culture, come per quelli contenuti nell'organismo animale; riguardo ad essi nulla abbiamo quindi da aggiungere a quanto si è già esposto nel capitolo apposito (1).

Si è detto che il bacillo tubercolare si presenta sempre cogli stessi caratteri, tanto nella tubercolosi dell'uomo, come in quella degli altri mammiferi; nella *tubercolosi dei gallinacei*, invece, il bacillo specifico ha caratteri alquanto diversi da quello dei mammiferi, e tali da far ritenere che i due bacilli appartengano a specie diverse, o per lo meno a diverse varietà della stessa specie.

È stato Maffucci (2) che ha delineato pel primo nettamente siffatte differenze, le quali si riferiscono sia alle proprietà morfologiche e di sviluppo, e sia specialmente alla maniera di agire negli animali. Il bacillo della tubercolosi dei gallinacei nelle culture è più lungo e più sottile, e quando è colorato contiene un minor numero di spazî chiari che quello dei mammiferi; nei tessuti invece si presenta assai granuloso. Cresce bene a 37° C., come anche a 42-43° C., conservando inalterata la sua virulenza; il suo sviluppo

(1) Ricordiamo ancora a questo riguardo il fatto trovato da Sabouraud (*Annales de l'Institut Pasteur*, 1892, *pag.* 184), che posso confermare anche per mia esperienza, che, cioè, il metodo proposto da Lustgarten per la colorazione dei presunti bacilli della sifilide, serve assai bene per rivelare la presenza dei bacilli tubercolari ne' tessuti, anche se essi sono in piccol numero. Allorquando poi si tratta di tessuti induriti nel liquido di Müller, si può usare con vantaggio un altro metodo proposto da Letulle (Gazette hebdomadaire, 1892, N. 22, pag. 263), e che consiste nel colorare dapprima le sezioni coll'ematossilina e tenerle poscia immerse per $^1/_4$ d'ora in una soluzione satura di rubina nell'acqua fenica 2 $^0/_0$: dopo di ciò le sezioni si lavano nell'acqua, si passano nell'alcool assoluto ($^1/_2$ minuto) e si colorano finalmente in una soluzione di verde di jodo (1 gr. in 100 d'acqua fenica 2 $^0/_0$), trattandole poscia come di solito. I bacilli appaiono colorati in rosso intenso e i nuclei in violetto.

(2) Maffucci, *Contribuzione all'eziologia della tubercolosi* (*Tubercolosi dei gallinacei*), Riforma medica N.° 119 e 120, 1890.

nell'agar e nel siero solido è già visibile dopo 6-8 giorni, sotto forma di massa cerea, biancastra e molle, e nei mezzi liquidi cresce non soltanto sulla superficie, ma intorbida uniformemente tutto il liquido, cosa che non fa mai il bacillo della tubercolosi dei mammiferi. Esso si colora più facilmente di quest'ultimo, e la sua colorazione resiste egualmente all'azione degli acidi minerali.

Altre differenze, più spiccate, si verificano nel potere patogeno dei due bacilli, e nella costituzione istologica della neoformazione specifica da essi prodotta.

Difatti una delle caratteristiche istologiche del tubercolo nei mammiferi è la presenza delle così dette « cellule giganti », polinucleate, le quali secondo Baumgarten (1) provengono dalla proliferazione nucleare delle cellule epitelioidi, e secondo altri invece (Jersin (2)) dalla fusione dei leucociti: orbene nella tubercolosi dei polli le cellule giganti non si rinvengono, ma si trova invece una scarsa infiltrazione linfoide, ed i bacilli sono molto più abbondanti che nel tubercolo dei mammiferi.

Oltre a ciò, il bacillo tubercolare dei mammiferi, inoculato nei polli per qualunque via, riesce sempre senza effetto, mentre d'altronde quello dei gallinacei, inoculato sotto cute nelle cavie e nei conigli, vi produce per lo più un ascesso locale, ma non la tubercolosi generale, e soltanto in rari casi dà luogo a qualche tubercolo viscerale isolato.

L'innesto del bacillo della tubercolosi dei polli nei cani, secondo Héricourt e Richet (3), serve a renderli immuni contro l'innesto della tubercolosi dei mammiferi.

L'innesto fatto negli animali coi prodotti patologici, o colle culture pure del bacillo tubercolare (parliamo quind'innanzi soltanto della tubercolosi dei mammiferi) riproduce costantemente la malattia caratteristica, ma con fenomeni alquanto diversi a seconda della via d'innesto, e a seconda della specie animale.

Degli animali comuni d'esperienza, i più sensibili per l'infezione tubercolare sono le cavie; viene in seguito il coniglio, il gatto e il topo campestre. Meno sensibile è invece il cane, il topo bianco ed il ratto. Coll'esperienze negli animali si è riprodotta la malattia, inoculando il virus per le vie più diverse: sottocute, nella

(1) Baumgarten, *Ueber Tuberkul und Tuberculose*, Zeitschr. f. klin. Med. Vol. IX e X, 1885.

(2) Jersin, *Étude sur le développement du tubercul expérimental*, Annales de l'Institut Pasteur, 1888, p. 245.

(3) Héricourt et Richet, *La vaccination tuberculeuse chez les chiens*, Le Bulletin méd. 1892, N. 29 e N. 48.

camera oculare anteriore, nel peritoneo, nel sangue, negli organi respiratorî per inalazione, e per la via degli organi digerenti, per mezzo del cibo.

Eccettuato il caso dell'iniezione dei virus nei vasi sanguigni, cogli altri modi d'innesto la malattia si manifesta sempre dapprima con fenomeni locali, e poscia, a poco a poco, si generalizza e conduce alla morte. Se l'innesto si fa sotto la cute, si forma dapprima sul luogo una raccolta di pus, che per lo più si fa strada al di fuori, formandosi così un'ulcera locale; le ghiandole linfatiche vicine si tumefanno, degenerando in sostanza caseosa, e l'animale muore dopo 4-8 settimane con una tubercolosi diffusa degli organi interni. Specialmente il fegato e la milza si mostrano infarciti di tubercoli, in vario grado di sviluppo. Lo stesso quadro si ripete per l'innesto intraoculare, o nel peritoneo.

Se invece l'innesto si fa per le vie sanguigne con una diluzione di cultura, si ha una tubercolosi miliare diffusa, e la morte dell'animale avviene più rapidamente (2 a 3 settimane), talvolta anzi così rapidamente, che il processo di neoformazione tubercolare si trova appena iniziato nei visceri, tutto attorno ai punti dove si sono depositati i bacilli specifici (Jersin).

A che si deve l'azione di tali bacilli?

Koch è riuscito ad estrarre dalle culture una sostanza, o a meglio dire una miscela di sostanze solubili, che iniettata negli animali dà luogo a produzione locale di pus, e li uccide, o li preserva dall'infezione, a seconda della quantità che si inietta, come si dirà in appresso; ma l'azione di tale estratto non può essere paragonata a quella del bacillo vivente, mancando la riproduzione della parte più integrante della malattia, che è la neoformazione tubercolare.

Secondo altre ricerche invece (1), la sostanza attiva risiederebbe nel corpo degli stessi bacilli, giacchè l'iniezione dei bacilli uccisi col calore, fatta nelle vie sanguigne, riprodurrebbe il quadro della tubercolosi diffusa, con neoformazioni multiple viscerali, perfettamente eguale a quello che si ottiene coll'iniezione dei bacilli viventi, mentre l'iniezione sottocutanea dello stesso materiale produce soltanto un'azione piogena locale.

Ci esprimiamo con qualche riserbo a riguardo del risultato interessante di tale esperimento, aspettando che esso venga ampiamente confermato, e che sia

1) Prudden e Hodenpyl, *Studies on the action of dead Bacteria in the livingbody*, New-York med. Journ. 6 e 20 Giugno, 1891.
— Strauss e Gamaleia, *Contribution à l'étude du poison tuberculeux*, Archives de méd. expèr, 1891, p. 705.

dimostrato in maniera indiscutibile che tutti quanti i bacilli inoculati fossero realmente morti; giacchè, in tal caso, il solo bacillo tubercolare farebbe eccezione a quanto si verifica per gli altri batterî patogeni, i quali, inoculati privi di vita, vengono prontamente eliminati dall'organismo animale.

Nell'uomo la sede primitiva del male, nella più gran parte dei casi, è il polmone, ed i bacilli tubercolari possono penetrarvi coll'aria, per mezzo della respirazione. Come facciano essi ad arrivare per tal via nel nostro organismo è facile a comprendersi, allorquando si pensa che un'enorme quantità di essi si spande continuamente nel mondo esterno cogli sputi tubercolari, e che questi, disseccati e ridotti in polvere, possono sollevarsi nell'aria e per mezzo di essa arrivare nel polmone.

Dalle ricerche di Cornet (1) risulta infatti che il bacillo della tubercolosi non si trova, nei nostri climi almeno, sparso egualmente dappertutto nel mondo esterno, ma che la sua presenza si limita, invece, soltanto a quei luoghi dove per qualche tempo ha soggiornato un tisico. Dalle stesse ricerche risulterebbe anche un altro fatto importante, che, cioè, alla diffusione dei bacilli tubercolari cogli sputi contribuisce non tanto lo sputare in terra, quanto piuttosto lo sputare nei fazzoletti; sia perchè gli ammalati, per un certo riguardo, sputano nel fazzoletto più che in terra, e sia perchè lo sputo, che nella tela presto si dissecca, si riduce facilmente in polvere e si mescola coll'aria, ogni volta che il paziente tira fuori il fazzoletto per deporvi lo sputo.

Lo sputo dei tisici può essere adunque un mezzo potente di diffusione della tubercolosi nell'uomo; si deve quindi cercare di ridurre al minimo possibile il pericolo di tale diffusione. Per tale scopo bisogna fare in modo che i tisici, invece di sputare in terra o nei fazzoletti, depongano lo sputo entro appositi recipienti (sputacchiere), per potere poscia distruggere la virulenza di quel materiale prima che si espanda nel mondo esterno.

Si è perciò proposto da taluni l'uso di speciali sputacchiere portatili, di vetro, da consegnarsi ai tisici perchè vi sputino dentro; ma se questo, che sarebbe il miglior mezzo, non potesse per ragioni d'indole pratica acquistare la voluta diffusione, bisognerà almeno cercare di diffondere più che si può l'abitudine di raccogliere gli sputi entro appositi recipienti, anzichè deporli nel fazzoletto, o gettarli in terra.

Per evitare che anche nelle sputacchiere gli sputi si dissecchino, si è proposto di tenere in esse una certa quantità di liquido disinfettante; ma ciò ha l'inconveniente dello spruzzamento di particelle liquide al di fuori del recipiente, prodotto dall'atto stesso del gettarvi lo sputo. È preferibile invece l'altro sistema di porre entro le sputacchiere una sostanza solida ed umida, che trattenga lo sputo senza

(1) Cornet, *Die Verbreitung der Tuberkelbacillen ausserhalb des örpers*, Zeitschr. f. Hygiene, 1889, Vol. V, pag. 191.

lasciarlo disseccare. Fra le varie sostanze per ciò proposte, parmi si possa dare finora la preferenza ai trucioli fini di legno, bagnati, che si adoperano comunemente per l'imballaggio degli oggetti di vetro (1).

Raccolti gli sputi, resta ancora la questione se essi debbansi sterilizzare, oppure semplicemente gettare nelle latrine, come vorrebbe Cornet, vista la difficoltà di ottenere la distruzione dei bacilli negli sputi tubercolari, lasciando che essi periscano nella lotta coi batterî della putrefazione.

Anche ammettendo però l'esattezza delle riflessioni di Cornet, a noi pare sia miglior consiglio il distruggere la virulenza degli sputi, anche prima di mescolarli colle materie fecali, tanto più che ora, se si è dimostrato che le soluzioni ordinarie di sublimato e di acido fenico non raggiungono lo scopo, si è anche trovato nel lisolo, in soluzione al 10 % ed aggiunto agli sputi in quantità almeno eguale al loro volume, un mezzo sicuro per distruggere in 12 ore la virulenza degli sputi tubercolari (2).

Gli sputi tubercolari si possono anche sterilizzare, sicuramente e con lieve spesa, colla corrente di vapor d'acqua nell'apparecchio proposto da Kirchner (3), costruito sul tipo dello sterilizzatore del latte di Soxlet, adoperando però, in luogo delle sputacchiere di vetro (Kirchner), le quali si rompono facilmente nell'atto della sterilizzazione, recipienti di lamiera di ferro, smaltati in bianco, a forma di ciotola, come Heim (4) ha proposto. Basta tenere gli sputi, contenuti in questi recipienti, nella corrente di vapor d'acqua per mezz'ora, perchè restino sicuramente sterilizzati, e tuttavia adatti per la ricerca microscopica dei bacilli tubercolari.

Oltrechè pel polmone, i bacilli tubercolari possono penetrare nel nostro organismo anche per altre vie. Non sono rari infatti i casi in cui il virus si fa strada attraverso ferite della pelle, prodotte da oggetti inquinati cogli sputi dei tisici (rottura di sputacchiere), oppure da stromenti chirurgici infettati nell'atto di fare un'operazione sul vivente o un'autopsia cadaverica (tubercolo anatomico). Si è pure verificato il caso di trasmissione della malattia nei bambini, per mezzo della ferita del prepuzio circonciso, succhiata da persona affetta da tubercolosi polmonare.

Nell'uomo si ha inoltre una forma speciale di tubercolosi della pelle, così detta « lupus », la cui natura veramente tubercolare è stata accertata per opera delle esperienze di Koch, il quale è riuscito a dimostrare la presenza dei bacilli specifici nei nodi luposi, ed anche a coltivarli colle loro proprietà caratteristiche. Se però è nota la eziologia del lupus, non si conosce ancora esattamente la ragione del decorso clinico speciale di questa malattia. Secondo Leloir, sarebbe in relazione colla minor virulenza e col numero scarso dei bacilli nei tessuti.

(1) Prausnitz, *Die Verwendung der Holzwolle* (Packwolle) *als Füllmaterial für Spucknäfpe*, Münch. med. Woch. N.° 48, 1891.

(2) Spengler, *Untersuchungen über Desinfection tuberculösen Sputums*, Münch. med. Woch. N.° 45, 1891.

(3) Kirchner, *Sputumdesinfection bei Lungentuberculose*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 12, 1892 pag. 247.

(4) Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 13, 1893 pag. 831.

Nell'uomo può il virus tubercolare penetrare eziandio per la via degli organi genitali, e per quella dell'apparato digerente.

Per quest'ultima via succede spesso un'antoinfezione nei tisici, per opera degli sputi, i quali, venendo in parte deglutiti, possono così riprodurre il processo tubercolare nell'intestino. Ma più importante si è la trasmissione della tubercolosi, che può avere luogo negli organi digerenti per mezzo del latte e della carne di animali affetti dal male.

Quanto al latte, le osservazioni di Bollinger, di Bang, ed anche le mie personali, hanno dimostrato che il latte di vacche tubercolose può contenere i bacilli ed essere infettante, anche quando la mammella non è invasa dal male, in proporzione di circa 1 volta su 10. Se si pensa quindi alla notevole frequenza della tubercolosi viscerale, ed anche di quella locale della mammella, nelle vacche lattifere (specialmente poi nei dintorni delle città), si capisce anche quale importanza possa avere il latte per la diffusione della tubercolosi nell'uomo, e specialmente nei bambini, giacchè il bacillo specifico resiste all'azione del succo gastrico, e può nell'intestino riprodurre la malattia.

Fortunatamente abbiamo nel calore un mezzo sicuro di rendere innocuo il latte che contenga bacilli tubercolari; giacchè basta la temperatura di 70-80° C. per un'ora, o quella dell'ebollizione per qualche minuto per distruggere sicuramente la vitalità di questi bacilli.

Non soltanto il latte, ma anche i suoi prodotti, burro e formaggio, possono riuscir pericolosi, giacchè è dimostrato che il burro separato dal latte che contiene bacilli tubercolari ne contiene anch'esso, come ne contiene ancora, vivi e virulenti, anche dopo qualche mese (Galtier), il formaggio preparato con latte infetto.

È indispensabile perciò esercitare anzitutto una continua ed attenta sorveglianza igienica sulle vacche lattifere, e prescrivere in pari tempo di riscaldare ad una temperatura conveniente per uccidere i bacilli tubercolari, tanto il latte fresco, come quello destinato alla preparazione del burro e del formaggio.

Quanto alla carne muscolare degli animali tubercolosi, il pericolo che dall'ingestione di essa può provenire all'uomo è indubbiamente minore che pel latte, sia perchè il bacillo tubercolare nei muscoli si rinviene soltanto di rado, allorquando, cioè, la malattia è molto grave e diffusa, sia perchè vi si trova sempre in poca quantità, e sia finalmente perchè la carne si ingerisce d'ordinario dopo averla sottoposta, per la cottura, a temperatura elevata.

La tubercolosi intestinale si manifesta specialmente nei bambini, e ciò si deve probabilmente all'azione combinata di due fat-

tori: la predisposizione maggiore, e l'uso più comune del latte di vacca come alimento nell'età infantile.

Un altro mezzo, molto potente, di diffusione della tubercolosi nella specie umana è quello della *trasmissione ereditaria* del germe specifico.

Se sono finora poco numerosi i casi di tubercolosi congenita, fetale, descritti nell'uomo (1), ciò non esclude che in molti casi si possa trasmettere solamente qualche germe isolato, il quale manifesta la sua azione soltanto più tardi, nei varî periodi della vita estrauterina, e specialmente nella fanciullezza (ghiandole scrofolose, tumori bianchi, ecc.): e difatti le statistiche più accurate hanno dimostrato che il primo anno della vita estrauterina è quello in cui la mortalità per tubercolosi raggiunge il grado più alto. Esistono poi prove sperimentali, le quali dimostrano sia l'esistenza dei bacilli nello sperma di individui tubercolosi, e sia il passaggio degli stessi dalla madre al feto, e quindi la possibilità di una trasmissione ereditaria del male, tanto dall'organismo paterno che da quello materno.

Ricordiamo al proposito le importanti esperienze di Maffucci (2), le quali dimostrano che l'infezione tubercolare può persino risalire all'uovo. Egli infatti, inoculando culture attive di bacillo della tubercolosi dei gallinacei nelle uova fecondate, e facendole poscia incubare e schiudere, ha osservato che i pulcini muoiono dopo un tempo variabile da 20 giorni a 4 mesi, con lesioni tubercolari degli organi interni.

La questione dell'eredità della tubercolosi è stata studiata sperimentalmente negli animali, fra gli altri, anche da Gärtner (3), e questi avrebbe osservato che la tubercolosi addominale da innesto è quella che più facilmente è seguita dalla trasmissione ereditaria della malattia nei feti (cavia). Anche l'iniezione dei bacilli nel sangue è talvolta seguita dal passaggio di essi dall'organismo materno a quello fetale, ma ciò avviene più raramente. La tubercolosi sperimentale dei testicoli nelle cavie, nelle esperienze di Gärtner, non ebbe mai per conseguenza la trasmissione del virus ai feti, ma l'infezione si trasmise invece talvolta alla femmina, nella vagina e nell'utero. Egli ne conclude perciò che la trasmissione della tubercolosi per parte del padre debba essere un fatto estremamente raro.

Aggiungiamo infine che esistono per questa, come per le altre malattie infettive, condizioni speciali di recettività (predisposizione), non completamente conosciute finora, le quali favoriscono indubbiamente la trasmissione della malattia, e ne modificano anche il decorso

(1) Birch-Hirschfeld, *Zur Frage der Disposition für die tuberculöse Infection* (Rivista bibliografica nello Jahresber. di Baumgarten, 1890, pag. 298).

(2) Maffucci, *Ricerche sperimentali sull'azione dei bacilli della tubercolosi dei gallinacci e dei mammiferi nella vita embrionale ed adulta del pollo*, Riforma medica N.° 209 e 213, 1889.

(3) Gärtner, *Ueber die Erblichkeit der Tuberkulose*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 13, 1893, pag. 101.

e la localizzazione. Tali sono, ad es., le cattive condizioni igieniche, in generale, che si riassumono tutte nel vocabolo « miseria », lo stato di debolezza generale dell'organismo, la poca attività polmonare, le affezioni catarrali delle vie respiratorie, e così via. Non deve però il valore dei momenti predisponenti venire esagerato, come da taluni si è fatto, per non mettere in seconda linea le regole preventive, sopra accennate, le quali tendono ad eliminare le possibilità di trasmissione diretta del virus tubercolare.

La *diagnosi* di tubercolosi è ormai indissolubilmente legata alla dimostrazione dei bacilli caratteristici nei tessuti ammalati, o nei loro prodotti. Nelle neoformazioni tubercolari i bacilli si trovano in principio liberi fra le cellule linfoidi, e più tardi racchiusi nelle cellule epitelioidi e in quelle giganti, nelle quali per lo più assumono una posizione caratteristica, entro la parte centrale della cellula caduta in necrobiosi, dal lato opposto a quello in cui sono accumulati i nuclei (Tav. V, fig. 11). Ma progredendo il processo, e con esso la necrosi degli elementi neoformati, anche i bacilli vengono distrutti, cosicchè nelle masse caseose centrali dei nodi tubercolari essi non si trovano, o sono scarsi, mentre si osservano abbondanti alla periferia, là dove la neoformazione specifica è più recente.

Nelle pareti delle caverne polmonari dei tisici, a lato dei bacilli tubercolari, si trovano anche altre forme di microrganismi, fra i quali merita d'esser ricordato il *micrococco tetragono*, scopertovi da Koch, che si mostra patogeno per gli animali (topo, cavia), e non si sa ancora quale parte possa avere nel processo distruttivo del polmone, eventualmente insieme anche ad altri batterî, i quali, come si è detto, si rinvengono negli sputi (streptococchi).

La presenza dei bacilli tubercolari negli sputi dei tisici serve per stabilire con certezza la diagnosi di tubercolosi polmonare; riesce quindi molto importante il poterli dimostrare coll'esame microscopico, specialmente nei primordî della malattia, per poter intraprendere subito una cura conveniente.

Senza ritornare sui metodi già esposti per tale ricerca, aggiungiamo soltanto, che nel caso di reperto negativo bisogna ripetere l'esame parecchie volte, giacchè talora accade che i bacilli scompaiono temporaneamente dagli sputi, per riapparirvi più tardi.

Si è molto discusso se i bacilli tubercolari possano, oltrechè collo sputo, venire eliminati anche coll'aria di espirazione dei tisici; ed a questo riguardo possiamo affermare con sicurezza che in condizioni ordinarie nell'aria d'espirazione non si contengono microrganismi, e quindi neppure i bacilli tubercolari nel caso di tubercolosi

polmonare, come hanno dimostrato con esperienze esatte Celli e Guarnieri (1), i quali hanno provato eziandio che, facendo gorgogliare fortemente l'aria attraverso lo sputo ricco di bacilli, questi non vanno mai a mescolarsi coll'aria che ha attraversato lo sputo.

I bacilli tubercolari si possono anche trovare nelle *orine*, allorquando il processo colpisce l'apparecchio urinario, nel *latte* di donna, in caso di tubercolosi mammaria, e nelle *feci*. In quest'ultimo caso non sempre la presenza dei bacilli serve ad indicare l'esistenza di un processo tubercolare nell'intestino, giacchè, se vi è tubercolosi polmonare, possono i bacilli deglutiti cogli sputi comparire nelle feci, senza che abbiano riprodotto nell'intestino il processo morboso.

La ricerca dei bacilli nell'urina e nel latte si fa, previa centrifugazione o sedimentazione del liquido a bassa temperatura, nella parte che si raccoglie in fondo ai recipienti. I preparati di latte, fissati sui vetrini, si trattano coll'etere, oppure con una soluzione di carbonato sodico all'1 % prima di colorarli, per disciogliere il grasso e per facilitare così la ricerca dei bacilli.

Per la ricerca dei bacilli tubercolari nel latte Ilkewitsch (2) ha proposto un'utile modificazione al processo di centrifugazione, che consiste nell'adoperare per questa tubi di rame, il cui fondo, conico, si può distaccare dal tubo, dopo aver centrifugato il latte, separando il contenuto del fondo dal resto del liquido, mediante una palla sospesa ad un filo, prima di distaccare il fondo conico dal tubo. Il latte, prima di essere sottoposto alla centrifugazione, deve subire le manipolazioni seguenti: 20 cc. di latte si fanno coagulare coll'acido citrico, si separa colla filtrazione la caseina precipitata, si discioglie in una soluzione acquosa di fosfato sodico, vi si mescolano 6 cc. di etere solforico misto ad acqua e si agita finchè il grasso si è disciolto; dopochè il grasso si è raccolto alla superficie, lo si toglie via, e il liquido digrassato si sottopone alla centrifugazione nella maniera anzidetta. In tal modo i bacilli si ottengono raccolti in una piccola quantità di liquido, e possono quindi essere messi in evidenza col semplice esame microscopico, anche meglio che coll'innesto negli animali.

Nel *sangue*, come si è detto, si trovano specialmente nei casi di tubercolosi miliare, ed allorquando il processo tubercolare si diffonde alle pareti di grossi vasi sanguigni.

(1) Celli e Guarnieri, *Intorno alla profilassi della tubercolosi*, Archivio per le scienze mediche, Vol. IX, 1883, pag. 233.

(2) Ilkewitsch, *Neue Methode zur Entdeckung von Tuberkelbacillen in der Milch mittels der Centrifuge*, Münchener med. Wochenschr. 1892, N. 5, pag. 69.

I bacilli tubercolari, come sono resistenti all'azione dei colori d'anilina, così lo sono pure a quella degli agenti esterni, fisici e chimici, e della putrefazione.

Essi infatti resistono a gradi di temperatura abbastanza elevati, giacchè secondo le osservazioni di Forster (1) la temperatura di 60° C. non li uccide sicuramente neppure dopo 1 ora, e quella di 70° C. li uccide in 10 minuti; oltre a ciò resistono all'azione del succo gastrico acido (2), si mantengono per parecchi mesi vivi e virulenti negli sputi disseccati (3), e resistono anche più lungamente all'azione della putrefazione, come lo provano, fra le altre, le osservazioni di Schottelius (4), il quale ha trovato che si mantengono per anni inalterati e viventi sotterra nei cadaveri dei tubercolosi.

Vi sono tuttavia alcune specie di batterî, i quali vincono nella concorrenza vitale i bacilli tubercolari; e di tal fatto si è cercato anche di trarre profitto per la cura della tubercolosi polmonare (5), introducendo nel polmone ammalato batterî non patogeni, capaci di impedire lo sviluppo dei bacilli di Koch. Questi tentativi di *batterioterapia* non hanno però sortito l'effetto desiderato.

Molto più razionale è invece un altro tentativo di cura, fatto per opera dello stesso Koch (6), mediante l'iniezione dell'estratto glicerico delle culture del bacillo specifico, da lui chiamato « tubercolina », sia negli animali, come nell'uomo.

Il processo d'estrazione della tubercolina, come viene descritto da Koch nella sua ultima comunicazione, è il seguente: si raccoglie il prodotto delle culture pure dei bacilli in agar glicerinata, al punto culminante del loro sviluppo (4-5 settimane), si tratta con una soluzione di glicerina al 4 %, si evapora a bagno maria finchè il liquido è ridotto a $^1/_{10}$ del volume primitivo, e si filtra nella candela Chamberland.

Lo stesso estratto si può ottenere anche più facilmente dalle culture del bacillo in brodo peptonizzato, contenente il 4-5 % di glicerina. Si prendono a tal uopo

(1) Forster, *Ueber die Einwirkung von hoher Temperaturen auf Tuberkelbacillen*, Hygienische Rundschau, 1892, pag. 869.

(2) Zagari, *Sul passaggio del virus tubercolare pel tubo digerente del cane*, Giorn. internaz. Scienze mediche, fasc. IX, 1889.

(3) Galtier, *Dangers des matières tuberculeuses qui ont subi le chauffage, la dessication*, ecc. Comptes rendus Acad. Sciences, 1887.

(4) Schottelius, *Ueber Temperatursteigerung in beerdigten Phthisikerlungen*, Centrablatt f. Bacteriologie Vol. VII, 1890, p. 265.

(5) Cantani, *Versuch einer Bacterioterapie*, Centralbl. f. med. Wissenschaften, 1883, p. 513.

(6) Koch, *Ueber bacteriologische Forschung*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. VIII, 1890, p. 563.

Id. *Weitere Mittheilungen über ein Heilmittel gegen Tuberculose*, Deutsche med. Woch, 1890 N.° 46 a'.

Id. *Forsetzung der Mittheilungen über ein Heilmittel gegen Tuberculose*, Deutsche med. Woch, 1891, N.° 3.

Id. *Weitere Mittheilung über Tuberculin*, Deutsche med. Woch, 1891, N.° 43.

palloncini Pasteur capaci di circa 100 cc., si riempiono di brodo fino a metà, si sterilizzano e vi si fa l'innesto dei bacilli tubercolari, in modo che pezzetti di cultura restino a galla sulla superficie del brodo. Dopo 6-8 settimane di sviluppo a 37° C., si raccolgono queste culture in apposito recipiente, si fanno evaporare a bagno maria (100° C.) fino ad $^1/_{10}$ del volume primitivo, e si filtrano.

Questa è la *tubercolina greggia*, la quale tenuta in recipienti sterilizzati si mantiene lungamente inalterata ed attiva Koch ha da essa preparato anche una *tubercolina purificata*, mediante precipitazione coll'alcool a 60 % e successivo lavamento ed essiccazione. Quest'ultima tubercolina però, secondo lo stesso Koch, non avrebbe alcun vantaggio apprezzabile sulla prima, nè riguardo agli effetti, nè riguardo al dosamento della quantità da iniettare.

Di qual natura sia la sostanza attiva della tubercolina non è ancora ben determinato: secondo Koch, essa non appartiene nè agli alcaloidi, nè alle ptomaine, ma è piuttosto affine agli albuminoidi.

Ci limitiamo alla descrizione del processo di Koch per la preparazione della tubercolina, senza tacere però che anche altri, fra i quali specialmente Huepp e e Scholl (1), hanno ottenuto lo stesso estratto, anche prima che Koch esponesse la maniera di prepararlo. Su questi altri processi di preparazione della tubercolina non ci fermiamo, perchè il prodotto che se ne è ottenuto ha, su per giù, gli stessi effetti della tubercolina di Koch. Aggiungiamo soltanto che Roux (2) adopera culture del bacillo dei gallinacei, ed usa sottoporre le culture in brodo a temperatura elevata nell'autoclave, prima di adoperarle, per uccidere sicuramente tutti i bacilli, facendo poscia la filtrazione semplicemente attraverso carta bibula, ed avvertendo con ragione che, se il filtrato contiene anche qualche bacillo, ciò non può esser di danno, giacchè le iniezioni di tubercolina si fanno sottocute, ed i bacilli sono morti sicuramente.

Secondo Koch la tubercolina in piccole dosi produce nell'individuo sano (uomo ed animali) effetti diversi che in quello affetto da tubercolosi, cosicchè può servire come mezzo sicuro di diagnosi della malattia. Dosi inferiori ad 1 centigr., iniettate sottocute in un uomo sano, non producono alcun effetto sensibile, mentre invece iniettate in una persona affetta da tubercolosi destano in essa una reazione generale (elevazione febbrile della temperatura), ed una reazione locale nelle parti affette da tubercolosi, la quale, se la parte è visibile, come nel lupus, si manifesta sotto forma di arrossamento e tumefazione dei nodi specifici.

Il valore diagnostico di un tal mezzo però non si può dire nell'uomo sicuramente confermato, essendosi osservate eccezioni abbastanza numerose al fatto suesposto della reazione caratteristica in seguito all'iniezione di tubercolina. Negli animali invece, secondo le osservazioni di Nocard, di Bang, e di altri (3), servirebbe assai

(1) Berl. klin. Wochenschrift, N.° 4 e 8, 1891.

(2) Roux, *La tuberculine, Revue critique*, Annales Pasteur, Vol. V, 1891, pag. 722.

(3) Nocard, *Sur l'emploi de la tuberculine comme moyen de diagnostic de la tuberculose bovine*, Semaine médicale 1891, pag. 416 e 467. — Annales de l'Institut Pasteur, 1892, pag. 44.

meglio, specialmente in quei casi in cui cogli ordinarî mezzi di diagnosi riesce quasi impossibile nei bovini diagnosticare la malattia. Nocard infatti ne propone l'uso sistematico nella visita delle vaccherie, affermando che, secondo le sue osservazioni, l'iniezione di 30-40 centigrammi di tubercolina produce quasi costantemente nei bovini affetti da tubercolosi un'elevazione di temperatura di 1-3° C, che si manifesta generalmente da 12 a 15 ore dopo l'iniezione, e serve in tal modo a rivelare l'esistenza della tubercolosi locale di qualche organo interno, che non sarebbe rilevabile con altri mezzi. Secondo Nocard la tubercolina non avrebbe neppure alcun effetto nocivo, nè sul decorso della gravidanza, nè sulla secrezione del latte.

Ma molto più importante sarebbe l'azione curativa attribuita da Koch alla tubercolina per la guarigione della tubercolosi negli animali e nell'uomo.

Riguardo alle esperienze negli animali, Koch e Kitasato (1) affermano di avere ottenuto la guarigione delle cavie affette da tubercolosi generale, mentre invece i tentativi ripetuti da altri nello stesso animale sono riusciti negativi (2). Anche sulla tubercolosi locale sperimentale, di fronte ai risultati positivi ottenuti da Dönitz (3) sulla guarigione della tubercolosi oculare nei conigli, sonvi quelli recisamente negativi ottenuti da Baumgarten (4), e da Czaplewski e Roloff (5), cosicchè la questione resta ancora, per lo meno, indecisa.

Altrettanto si può dire riguardo alla parte clinica della questione. Secondo Koch ed altri, si hanno casi di guarigione sicura di tubercolosi nell'uomo, ottenuti colla tubercolina, specialmente nelle forme lupose e nella tubercolosi polmonare *incipiente*. L'azione della tubercolina si spiega non sul bacillo, ma sibbene sul tessuto tubercolare, il quale per opera di quella sostanza cade in necrobiosi, restando in tal modo impedita anche la vita e lo sviluppo del microrganismo. Secondo Virchow però un tal fatto, anzichè essere favorevole pel decorso della malattia, renderebbe invece più facile la diffusione del germe specifico, specialmente nella tubercolosi degli organi interni.

(1) Kitasato, *Ueber die Tuberculin-Behandlung tuberculöser Meerschweinchen*, Zeitschr. f. Hygiene Vol. X, 1892, pag. 321.

(2) V. Rivista di Metchnikoff sul lavoro di Pfuhl, *Beitrag zur Behandlung tuberculöser Meerschweinchen mit Tuberculinum Kochii* (Zeitschr. f Hygiene, Vol. 11°, 1891, pag. 241) negli Annales de l'Institut Pasteur, 1891, pag. 732.

(3) Dönitz, *Ueber die Wirkung des Tuberculins auf die experim. Augentuberculose*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 47, 1891.

(4) Baumgarten, *Ueber die Einwirkung des Koch' schen Mittels auf die Impftuberculose der Kaninchen*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 19, 1891.

(5) Czaplewski u. Roloff, *Beiträge zur Kenntniss der Tuberkulinwirkung bei der experimentellen Tuberkulose der Kaninchen und Meerschweinchen*. Berliner klin. Wochenschr. 1892, N. 29.

Per nostro conto, senza volere arrischiare un giudizio assoluto, che sarebbe forse prematuro e quindi facilmente fallace nello stato attuale della questione, possiamo però dire con coscienza che il metodo di cura della tubercolosi, proposto da Koch, non ha finora corrisposto a quanto in principio si era annunciato. Errano forse tanto i detrattori ostinati, quanto coloro che lo esaltano oltre misura; forse, passato questo periodo di ricerca febbrile, si potrà in seguito con calma osservare più attentamente, e conoscere con maggiore sicurezza i vantaggi pratici della scoperta di Koch.

Aggiungiamo soltanto che la tubercolina è un veleno altamente potente, e che va quindi adoperata nell'uomo con grande cautela, per non averne conseguenze funeste. Ora specialmente che esistono tubercoline di varia provenienza, si dovrà sempre saggiarne la virulenza prima di usarle nell'uomo; ed a tal uopo il miglior reagente è l'organismo della cavia tubercolosa, giacchè, se ad una cavia, che sia stata inoculata con bacillo tubercolare da 4-5 settimane, si iniettano sotto la pelle 5 decigrammi di tubercolina greggia, oppure una dose di sostanza estratta da essa, corrispondente a quella quantità, l'animale muore sicuramente dopo 6-30 ore, se il materiale adoperato è veramente attivo (Koch). Oltre a ciò, secondo Koch, il reperto necroscopico degli animali morti in tal guisa sarebbe caratteristico, per la presenza sulla superficie della milza e del fegato, affetti da tubercolosi, di macchie di aspetto ecchimotico, le quali al microscopio si presentano invece composte da un enorme dilatazione dei capillari, ripieni di globuli rossi, tutto attorno ai focolaj di tubercolosi.

Questi fatti però, secondo le osservazioni di Roemer (1) e di Buchner (2), non sarebbero per nulla caratteristici della tubercolina, giacchè tanto la morte delle cavie tubercolose, come il reperto necroscopico descritto da Koch, si hanno egualmente coll'iniezione degli estratti di altri microrganismi, quali il bacillo piocianeo, il prodigioso e il pneumobacillo di Friedländer.

Aggiungiamo qui, quasi a titolo di appendice, che vi sono anche altri microrganismi, capaci di produrre negli animali alterazioni anatomiche simili a quelle della tubercolosi, e che hanno fatto dare perciò alla malattia il nome di « pseudotubercolosi », o «*tu-*

(1) Roemer, *Tuberculinreaction durch Bacterienextracte*, Wiener klin. Wochenschr. N.° 45, 1891.

(2) Buchner, *Tuberculinreaction durch Proteine nicht specifischer Bacterien*, Münch. med. Wochenschr. N.° 49, 1891.

bercolosi zoogleica », come è piaciuto chiamarla, con espressione poco felice, alla scuola francese (1), che ha per la prima rivolta l'attenzione a siffatta malattia.

Casi spontanei di tale infezione sono stati osservati nel coniglio, nella cavia (2), nel cavallo (3) e nel bue (4), e, secondo le osservazioni più accurate degli ultimi osservatori, pare si debbano tutti ad un' unica specie di microrganismo, di forma bacillare, di varia lunghezza, talora anche cocciforme, i cui individui hanno molta tendenza a riunirsi a catene ed a gruppi (zooglea). Le neoformazioni nodulari che si producono negli animali in seguito all'innesto di questo bacillo sono però di struttura assolutamente diversa da quella del tubercolo vero, e sono in massima parte composte da leucociti Pfeiffer).

L'esistenza di una tal forma morbosa non toglie nulla al valore specifico del bacillo di Koch riguardo alla tubercolosi, come da alcuni si è detto, giacchè le due malattie si differenziano profondamente e per l'eziologia, anzitutto, e secondariamente anche per la qualità delle alterazioni anatomiche che le accompagnano.

6. Bacillo della lebbra.

La presenza di bacilli nelle neoformazioni lebbrose è stata la prima volta constatata coll'osservazione microscopica da un medico norvegese, Armauer Hansen (5). In seguito Neisser (6) ha confermato ed ampliato tale scoperta, dimostrando la presenza costante dei bacilli nei tessuti leprosi e colorandoli colle sostanze d'anilina, secondo il metodo di Weigert e di Koch.

I bacilli della lebbra hanno un aspetto molto simile a quello dei bacilli tubercolari, coi quali hanno anche altri punti di contatto. Sono lunghi in media da 5-6 μ, per lo più incurvati leggermente, e trattati coi colori d'anilina mostrano nel loro interno una serie di spazî chiari, i quali, come quelli dei bacilli tubercolari, non possono, almeno finora, venire interpretati quali spore. L'esistenza di questi spazî chiari impartisce al bacillo, specialmente se trattato con certi metodi di colorazione, l'aspetto di catena di

(1) Malassez et Vignal, *Sur le microrganisme de la tuberculose zoogleique*, Archives de physiologie, 1883 e 1884.

(2) Eberth, *Der Bacillus der Pseudotuberculose des Meerschweinchen und Kaninchens*, Virchow's Archiv. Vol. CII, 1886, pag. 488.

(3) Pfeiffer, *Ueber bacilläre Pseudotubercolose bei Nagethieren*, Leipzig, 1889.

(4) Cormont, *Sur une tuberculose microbienne et particulière du boeuf*, Comptes rendus, societé de Biologie, 1889. pag. 215 e 512.

(5) Virchow's Archiv, Bd. LXXIX.

(6) Neisser, *Histologische und bacteriologische Lepraunterschungen*, Virchow's Archiv. CIII, 1886.

granuli cocciformi (*coccotrix* di Lutz (1)). Secondo Neisser (2) tali granuli rappresentano il nucleo del bacillo, il quale è avvolto da una membrana che può nascondere, se colorata, la struttura interna dell'individuo cellulare. I granuli difatti si pongono bene in evidenza, sia trattandoli col jodo (metodo Gram) e sia decolorando fortemente il preparato.

Le estremità dei bacilli della lebbra sono per lo più rigonfie leggermente a mo' di clava. Tali rigonfiamenti claviformi appaiono specialmente evidenti nei bacilli trovati da Sudakewitsch (3) nelle cellule dei gangli nervosi, ed in quelli da me descritti nel midollo delle ossa e nelle culture da esso ottenute.

Il bacillo della lebbra, secondo la maggior parte degli osservatori, non è dotato di mobilità; alcuni invece accennano all'esistenza di movimenti proprî nei bacilli, sia nei tessuti che nelle culture (Gianturco).

I bacilli della lebbra sono gli unici microrganismi, finora conosciuti, i quali resistono al metodo di colorazione Koch-Ehrlich, come quelli della tubercolosi. Si distinguono però da questi ultimi per ciò che si colorano molto più facilmente e più rapidamente, anche colle semplici soluzioni idralcooliche. Su questa proprietà è fondato appunto il metodo di colorazione differenziale, proposto da Baumgarten (4), secondo il quale bastano 5-6 minuti di contatto con una soluzione idralcoolica di fucsina, per colorare bene i bacilli della lebbra, mentre quelli della tubercolosi in egual tempo non si colorano.

Se si tratta di preparati sui coproggetti, il miglior mezzo per colorarli è quello di trattarli col metodo di Koch-Ehrlich ordinario. Se si tratta di sezioni, basta tenerle per mezz'ora a contatto con una soluzione Ehrlich, preferibilmente di fucsina, decolorarle colla soluzione acida e colorarle poscia successivamente coll'azzurro di metilene.

Anche il metodo Gram corrisponde assai bene per la colorazione di questi bacilli.

Per ciò che riguarda la loro *coltivazione* al di fuori dell'organismo, dobbiamo dire che essa finora si è mostrata sempre molto difficile, forse perchè legata a qualche speciale condizione, che ci è

(1) Lutz, *Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra*, Dermatolog. Studien, Heft. I, Hamburg, 1886.

(2) Neisser, *Ueber die Structur der Lepra-und Tuberkelbacillen mit specieller Berücksichtigung des Rosanilin-und Pararosanilinfarbstoffe*, Archiv. f. Dermatol. und Syph. 1889, p. 29.

(3) Sudakewitsch, *Beiträge zur pathologischen Anatomie der Lepra*, Ziegler's Beiträge zur path. Anat. u. Phys. Vol. I, 1887.

(4) Baumgarten, *Ueber die Untersuchungsmethoden zur Unterscheidung von Lepra-und Tuberkel-Bacillen*, Zeitschrift f. wiss. Mikroskopie, Vol. I, 1884, p. 367.

ancora sconosciuta. Senza parlare dei tentativi infruttuosi fatti da Hansen, da Neisser (1) e da molti altri, dirò che a me (2) è riuscito ottenere sull'agar glicerinata, seminata con materiale lebbroso, una cultura di bacilli, i quali, per le loro proprietà morfologiche e per la maniera speciale di comportarsi di fronte al metodo Koch-Ehrlich, si addimostrano uguali a quelli contenuti nei tessuti leprosi, e sono stati quindi da me considerati come i bacilli specifici, per quanto si sieno da alcuni sollevati dubbì sulla loro identità.

Le culture si ottennero dal midollo delle ossa di un lebbroso, in cui la malattia era generalizzata a quasi tutto l'organismo, e che nei preparati microscopici si mostrava assai ricco di bacilli liberi.

Lo sviluppo nell'agar a 37° C., iniziatosi la prima volta 7 giorni dopo l'innesto, si è manifestato nelle prime culture sotto forma di piccole coloniette isolate, rotondeggianti (Tav. III, fig. 2), a margini frastagliati, ad accrescimento molto lento, e di aspetto reticolato (100-200 diam. d'ingrandimento). Negli innesti successivi invece, facendosi più rigoglioso e facile lo sviluppo, la colonia è già manifesta dopo 24 ore, e se l'innesto è fatto a stria, essa appare nastriforme, bianco-grigia, a margini frastagliati, e cresce lentamente e non si estende che pochi millimetri, lateralmente alla stria d'innesto. Nel siero di sangue solido, glicerinato, lo sviluppo si fa ugualmente sotto forma di nastro di colore giallognolo, simile a cera.

Nell'agar e nel siero non glicerinato lo sviluppo è più scarso e stentato; sulla patata e nel brodo non si sviluppa.

La temperatura ottima è 37° C.: al di sotto di 30° non si è sviluppato nei primi trapianti, e si è sviluppato invece nella gelatina, sotto forma di piccole colonie rotondeggianti, dopo alcuni mesi di vita saprofitica nell'agar e nel siero.

Il bacillo è anaerobio facoltativo; nell'agar, a 37° C., cresce nel vuoto, o in un'atmosfera d'idrogeno, altrettanto rigogliosamente che in presenza dell'aria.

I bacilli delle culture restano colorati col metodo Koch-Ehrlich, come quelli dei tessuti; si differenziano però alquanto da questi per le loro dimensioni un po' maggiori, e specialmente per la presenza quasi costante e per la grossezza dei rigonfiamenti claviformi. Sono queste appunto le differenze, per cui principalmente si è messa in dubbio l'identità dei bacilli da me coltivati con quelli dei tessuti lebbrosi.

(1) Neisser, *Histologische und bacteriologische Lepraunterschungen*, Virchow's Archiv., Vol. 103, 1886.

(2) Bordoni-Uffreduzzi, *La coltivazione del bacillo dalla lebbra*. Archivio per le scienze mediche, Vol. 12, 1887, pag. 53. — Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 3, 1888, pag. 178.

Debbo però far rilevare alcune circostanze di fatto, da me espresse nel mio lavoro, e non tenute in conto abbastanza dai miei contradittori, che, cioè, anzitutto i bacilli ottenuti dalle prime culture erano affatto simili, per forma e per dimensioni, a quelli dei tessuti (Tav. VI, fig. 1), e che soltanto nelle successive riproduzioni e coll'invecchiamento delle culture si fecero più grossi e manifesti i rigonfiamenti claviformi. Non si può pensare ad uno scambio coi bacilli tubercolari, sia pel risultato negativo avuto negli animali col primo materiale d'innesto e col prodotto delle culture, e sia per l'aspetto dei bacilli coltivati. Tanto meno poi è da rilevarsi l'obbiezione fatta da Kantack e Barclay (1), i quali affermano che nel midollo delle ossa i bacilli della lebbra non sono stati mai osservati da altri che da me. Oltrechè ciò non esatto, perchè anche Babès (2) ha fatto la stessa osservazione, il fatto sta ed è che nel caso da me osservato il midollo osseo conteneva in gran copia i bacilli della lebbra con tutte le loro proprietà morfologiche e di colorazione (Tav. VI, fig. 2).

Aggiungo infine che i miei risultati sono stati anche confermati dalle ricerche di Gianturco (3) e di Boinet (4). Il primo specialmente ha ottenuto da nodi leprosi cutanei, non ulcerati, culture che corrispondono alle mie in tutti i particolari, come ho potuto io stesso constatare, salvo il fatto della mobilità, che Gianturco crede aver osservato nei suoi bacilli.

Campana (5) afferma di essere riuscito, dopo lunghi tentativi infruttuosi, a coltivare dai nodi lebbrosi un bacillo anaerobio, simile per forma a quello dei tessuti, il quale però non resta colorata col metodo Koch-Ehrlich. Anche Ducrey (6) ha coltivato un bacillo anaerobio, che ritiene uguale a quello di Campana.

Gl'innesti delle culture negli animali (cavie, topi e conigli) hanno sempre avuto un risultato negativo, e ciò sta in relazione coi risultati dei numerosi tentativi di innesto, fatti da me e da molti altri con pezzi di tessuto leproso, i quali sono riusciti tutti negativi, ad eccezione di uno solo positivo ottenuto da Melcher e Orthmann (7) nel coniglio. Questo unico caso è stato general-

(1) Kantack e Barclay, *Ein Beitrag zur Cultur des Bacillus Leprae*, Virchow's Archiv. Vol. 125, 1891, pag. 398.

(2) Babés e Kalindero, *La lèpre en Roumanie*, Annales de l'Institut de Path. et de Bacter. de Bucarest, Vol. I, parte 1.ª 1888-89.

(3) Gianturco, *Ricerche istologiche e batteriologiche sulla lebbra*, Comunicazione fatta all'associazione dei medici e naturalisti, Napoli, 1889.

(4) Boinet, *La lèpre au Tonkin*, Sémaine méd. 1891, pag. 410.

(5) Riforma medica N.° 14, 1891.

(6) Giornale italiano delle malattie veneree e della pelle. Fasc. 1, 1892.

(7) Melcher u. Orthmann, *Uebertragung von Lepra auf Kaninchen*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 13, 1885.

mente accettato come un vero esempio di lebbra sperimentale, sotto l'egida della competenza batteriologica di Fränkel, il quale, dietro esame fatto dei visceri del coniglio inoculato, recisamente afferma trattarsi di lebbra e non d'altra malattia (1); con tutto questo però non si può dire escluso il dubbio che si trattasse di tubercolosi. E neppure l'esperimento fatto da Arning (2) non più sugli animali, ma sull'uomo, può dirsi scevro d'obbiezioni. Arning ha inoculato pezzi di nodi lebbrosi sottocute ad un uomo condannato a morte nelle isole Sandwich, perfettamente sano, ed ha potuto osservare iniziarsi lo sviluppo locale della malattia parecchi mesi dopo l'innesto, e progredire poscia lentamente fino a diventare generale nel decorso di circa cinque anni. A quest' esperimento però si è fatta l'obbiezione, che l'uomo su cui fu fatto l'esperimento apparteneva ad una razza molto disposta alla malattia, e, quel che più monta, apparteneva anche ad una famiglia di lebbrosi.

Fra le numerose prove fatte per riprodurre la malattia coll'innesto di materiale lebbroso, ricordiamo ancora l'esperimento di Tedeschi (3) dell' inoculazione subdurale fatta in una scimmia con un pezzetto di nodo lebbroso, inoculazione che ebbe per risultato la morte dell'animale in otto giorni con fenomeni di meningite cerebro-spinale, e di mielite. Nell'essudato denso che circondava il midollo spinale, ed anche nel liquido cefalo-rachidieno e nella milza, si trovarono abbondanti i bacilli, aventi gli stessi caratteri morfologici e di colorazione che quelli della lebbra.

Se i tentativi fatti finora per la riproduzione sperimentale della malattia non hanno dato risultati certi ed indiscutibili, tuttavia la presenza costante dei bacilli nei tessuti ammalati, nonchè il numero e la distribuzione loro parlano già indiscutibilmente in favore del nesso eziologico di essi collo sviluppo della malattia.

La lebbra può colpire infatti, come la tubercolosi, tutte le parti del nostro corpo, e dappertutto, nelle parti ammalate, si trovano abbondanti i bacilli caratteristici. La neoformazione lebbrosa ha forma nodulare, simile a quella della tubercolosi; se ne distingue però nell'intima struttura, per ciò che essa è costituita quasi esclusivamente da cellule linfoidi, con rarissime cellule giganti. I bacilli si trovano nell'interno delle cellule linfoidi, per lo più in così gran numero, da coprire il nucleo, ed allora la natura cellulare di tali ammassi di ba-

(1) Opera citata, pag. 337.

(2) Arning, *Lepra-Uebertragung durch Heredität oder Contagion*, Archiv f. Dermatol. u. Syphlis, Heft 1, 1891.

(3) Tedeschi, *Ueber die Uebertragung der Lepra auf Thiere*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. XIV, 1893, pag. 113.

cilli (così dette *cellule lebbrose*) si riconosce soltanto per la loro forma tondeggiante e regolare. È per ciò che Unna (1) ha creduto, basandosi sull'osservazione dei preparati allestiti col suo metodo del « dissecca-mento », che i bacilli lebbrosi fosser contenuti negli spazî linfatici e non nelle cellule. Quest'opinione però è stata dimostrata erronea da numerosi osservatori, i quali hanno provato che il metodo di Unna altera la struttura del tessuto, e può dar luogo quindi ad un'erronea interpretazione sulla posizione dei bacilli, mentre invece nei preparati ottenuti con altri metodi si può dimostrare la presenza del nucleo nelle cellule lebbrose, e quindi la posizione veramente intracellulare dei bacilli.

I bacilli della lebbra si trovano specialmente abbondanti nei nodi lebbrosi cutanei e nel connettivo che circonda i nervi periferici, giacchè è dalla pelle che ordinariamente comincia la malattia; si osservano però anche, egualmente, nelle neoformazioni lebbrose degli organi interni, e così nel fegato, nella milza, nel testicolo, nel polmone, nel midollo delle ossa e nei gangli nervosi. Nella così detta « lebbra anestetica » i bacilli non si trovano nella pelle, ma si rinvengono bensì nei tronchi nervosi. Nel sangue sembra che ordinariamente non esistano, e che vi si trovino invece nelle eruzioni acute, febbrili, della malattia (2).

Come si trasmetta e si diffonda la lebbra nell'uomo, non è ancora chiaramente accertato. Noi possiamo dire soltanto con sicurezza che l'uomo costituisce il veicolo principale del virus lebbroso, e che la malattia ha carattere contagioso: ma sul modo con cui avvenga la trasmissione, e sull'influenza che può su di essa avere l'eredità, non possiamo finora esprimerci in modo certo, essendo finora disaccordi le opinioni emesse in proposito dai diversi osservatori. Aggiungiamo soltanto che da Arning e da altri si ritiene possibile la trasmissione della lebbra anche per mezzo della vaccinazione, e che sono rimaste finora assolutamente infruttuose le ricerche, fatte nei paesi dove domina la lebbra, per trovare il bacillo specifico al di fuori dell'organismo, nell'aria, nell'acqua, nel terreno e negli alimenti.

(1) Unna, *Wo liegen die Leprabacillen?*, Deutsche med. Woch. 1886, N.° 8, pag. 123.

(2) Köbner, *Uebertragungsversuche von Lepra auf Thiere*, Virchow's Archiv Vol. 88, pag. 282.

7. **Bacillo della morva** (*moccio, o farcino*).

La morva è una malattia infettiva, accompagnata da neoformazioni simili a quelle della tubercolosi e della lebbra, che spontaneamente si osserva nel cavallo, nell'asino e nel mulo, ma che è trasmissibile, pur troppo, anche all'uomo, nel quale ha un decorso generalmente mortale.

Il microrganismo specifico di questa infezione è stato coltivato la prima volta allo stato di purezza da Löffler e Schütz (1), i quali ne hanno in pari tempo dimostrato la importanza eziologica, riproducendo la malattia negli animali coll'innesto della cultura pura del microrganismo.

Questo è un bacillo (Tav. VI, fig. 6 e 7), un poco più corto e più grosso di quello della tubercolosi, ad estremità arrotondate e privo di mobilità.

L'esistenza di una fase di sporificazione in questi bacilli è ancora controversa. Messa in dubbio da Löffler nel suo classico lavoro sulla morva (2), viene negata recisamente da Flügge (3) e da Boer (4), mentre Baumgarten e Rosenthal (5) affermano di avere osservato sicuramente le spore in culture vecchie del bacillo, fatte su patate. Notiamo però che il solo criterio della colorazione speciale col metodo Neisser, prodotto da questi ultimi in appoggio del loro asserto, non è sufficiente a provare indubbiamente l'esistenza delle spore.

Sulla colorazione di questo microrganismo non ritorniamo, essendosene già trattato in modo speciale.

Il bacillo della morva è anaerobio facoltativo, e si sviluppa facilmente sui mezzi ordinarî di nutrizione, ad una temperatura però non inferiore ai 25° C. Il grado ottimo è 37° C., e il limite massimo compatibile collo sviluppo è 42-43° C.

Cresce sulla superficie dell'agar sotto forma di patina biancastra, splendente, e su quella del siero di sangue in forma di goccie rotonde, trasparenti, di colore leggermente giallognolo, che più tardi confluiscono formando una patina vischiosa e splendente, senza fluidificare il siero. Specialmente adatta pel suo sviluppo è l'agar

(1) Löffler u. Schütz, *Ueber den Rotzpilz*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 52, 1882.

(2) Löffler, *Die Aetiologie der Rotzkrankheit*, Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamte, Vol I, 1886.

(3) Flügge, Grundriss der Hygiene, 1889, pag. 54.

(4) Boer, *Die Leistungsfähigkeit mehrerer chem. Desinfectionsmittel*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 9, 1890, pag. 481.

(5) Baumgarten, *Bacteriologische Mittheilungen*, Centralblatt f. Bacteriologie. Vol. 3, 1888, pag. 397.

glicerinata, dove secondo Kranzfeld (1) si sviluppa anche alla temperatura ordinaria dell'ambiente.

Veramente caratteristico è l'aspetto della cultura sulla superficie delle patate, tenute a 37° C. Essa si manifesta dapprincipio come uno straterello lucente, di colore giallo, simile a miele, il quale in seguito, a poco a poco, diventa opaco ed assume un colorito rossastro, che si fa sempre più scuro (Tav. IV, fig. 5). Siffatto aspetto della cultura sulle patate è assolutamente caratteristico del bacillo della morva, giacchè non è proprio di alcun altro microrganismo, ad eccezione, forse, del bacillo piocianeo, il quale cresce sulla patata con aspetto alquanto simile a quello ora descritto, ma con colorito più scuro.

Nelle culture i bacilli perdono rapidamente la loro virulenza, non solo, ma anche la vitalità. È necessario quindi, per conservarli, farne nuovi trapianti almeno ogni settimana, ed innestarli, di quando in quando, negli animali sensibili, per poscia coltivarli di nuovo dall'organismo ammalato.

Gli animali più sensibili per l'infezione morvosa sono, fra quelli domestici, il cavallo, l'asino, la capra, ed il gatto; meno sensibili è la pecora ed il cane adulto, mentre invece il cane giovane subisce facilmente l'infezione: il bue pare ne sia immune. Dei piccoli animali i più sensibili sono i topi campagnoli; viene poscia la cavia ed il coniglio. Il topo di casa ed i topi bianchi (grandi e piccoli) sono pressochè refrettarî per tale infezione.

È interessante il fatto, osservato da Leo (2), che si può far perdere ai topi bianchi quest'immunità naturale, dando loro da mangiare la *florizina*, la quale, come è noto, produce negli animali, ed anche nell'uomo, un diabete artificiale.

Se si inocula in un animale sensibile il prodotto di culture recenti di bacillo della morva, si riproduce in esso la malattia col suo decorso speciale, piuttosto lento, caratterizzato da alterazioni primitivamente locali, le quali poscia, a poco a poco, si generalizzano specialmente per la via dei vasi linfatici, giacchè nel sangue i bacilli di regola non si osservano. Soltanto nel topo campagnolo il decorso dell' infezione è assai più rapido, ed alquanto diverso; mancano infatti i fenomeni locali, e l' animale muore 3-4 giorni dopo l' innesto.

Le cavie invece, inoculate sottocute col virus moccioso, co-

(1) Kranzfeld, *Zur Kenntniss des Rotzbacillus*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 2.°, 1887, pag. 273.

(2) Leo, *Beitrag zur Immunitätslehre*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 7, 1889, pag. 505.

minciano ad ammalare localmente 4-5 giorni dopo l'innesto; ma la malattia impiega qualche settimana prima di diventar generale e produrre infine la morte.

Il decorso dell'infezione nella cavia, specialmente nel maschio, è così caratteristico, che merita di essere descritto, anche perchè è questo l'animale che si presceglie, allorquando si vuole stabilire sperimentalmente la diagnosi della malattia negli equini sospetti mocciosi, non potendo servire a tale scopo la semplice osservazione microscopica del secreto patologico, giacchè, come si è detto, non si conosce pel bacillo moccioso alcun metodo di colorazione speciale, che serva a distinguerlo dagli altri.

Se si inietta, adunque, sottocute ad una cavia il prodotto di una cultura attiva di bacilli, oppure il materiale virulento (secreto nasale, pus, ecc.) proveniente da un animale affetto da morva, si forma dapprima un tumore nel luogo d'innesto, che rapidamente si rammollisce e versa al di fuori il prodotto caseoso-purulento. Da questo si possono produrre anche altri tumori vicini, che hanno lo stesso esito, e progredendo la malattia, si ha tumefazione e rammollimento purulento delle ghiandole linfatiche e dei *testicoli* nei maschi, e tumefazione dei genitali esterni nelle femmine; si producono in seguito artriti purulente diffuse, e finalmente si ha la morte dell'animale con produzione di noduli miliari negli organi interni. Senza aspettare l'esito letale, si può anche prima stabilire il diagnostico della malattia colla dimostrazione dei bacilli specifici nel pus degli ascessi, fatta specialmente mediante le culture, perchè nel pus proveniente dal rammollimento dei tumori mocciosi i bacilli sono scarsi, ed è difficile dimostrarli colla semplice osservazione microscopica; si trovano invece abbondanti i bacilli nei nodi recenti, i quali hanno, come è noto, un aspetto macroscopico simile affatto a quello dei giovani nodi tubercolari.

Nella cavia le neoformazioni nodulari mocciose si trovano abbondanti e manifeste specialmente nella milza, mentre nel topo campagnolo si trovano pure abbondanti nel fegato, e talora anche nei polmoni, sotto forma di granuli minuti, appena visibili ad occhio nudo. Tali noduli si rendono però facilmente visibili, immergendo nell'alcool gli organi freschi degli animali infetti.

Quando si tratta però di stabilire prontamente la diagnosi di morva di un caso sospetto, val meglio, come ha proposto Straus (1), inoculare il materiale patologico nel peritoneo di una cavia maschio; giacchè in tal caso, già dopo 3-4 giorni, si rende manifesto l'ingros-

(1) Straus, *Revue vétérinaire*, juin, 1889.

samento dei testicoli e l'arrossamento della pelle che li ricopre, dovuti allo sviluppo di nodi specifici nella vaginale del testicolo. Senza aspettare la morte dell'animale, si apre la vaginale, e dall'essudato purulento che si trova in essa si fanno preparati microscopici e culture, per dimostrarvi la presenza dei bacilli.

Nel cavallo l'infezione si localizza specialmente nel polmone e nella mucosa nasale; ma non si sa ancora se il virus penetra primitivamente nel polmone, per mezzo della respirazione, oppure dal naso. Il fatto è che la mucosa nasale si trova cosparsa di tumori irregolari, a margini rilevati, da cui vien fuori un liquido tenue, che si espelle collo starnuto, e che contenendo i bacilli specifici serve a diffondere la malattia, ed è quindi specialmente pericoloso per l'uomo. Nell'uomo infatti la malattia si manifesta appunto in coloro, i quali per la loro professione (soldati, stallieri) possono facilmente venire a contatto con animali mocciosi, e il virus penetra generalmente dalla pelle attraverso lesioni di continuo, oppure anche attraverso la pelle intatta, come appare possibile dalle osservazioni di Babès (1). Riesce quindi molto importante lo stabilire fin da principio la diagnosi della malattia, sia per impedire la possibile sua diffusione all'uomo, e sia per procedere subito all'isolamento degli animali ammalati e alla disinfezione delle stalle.

Per la diagnosi della malattia può servire adunque l'innesto del secreto nasale sospetto nei piccoli animali (cavia maschio e topo campagnuolo), e la dimostrazione in questi dei bacilli specifici coll'osservazione microscopica e colle culture nei mezzi solidi, specialmente sulle patate. Havvi però anche un altro mezzo, recentemente proposto per stabilire la diagnosi di morva, e questo è l'iniezione dell'estratto acquoso-glicerico delle culture del bacillo specifico (*malleina*), il quale, iniettato sottocute negli animali affetti da morva, produce, come la tubercolina negli animali tubercolosi, una reazione febbrile, che manca invece negli animali sani (2).

La malleina si può preparare, come la tubercolina, con diversi processi. Fra questi citiamo, come i migliori, perchè forniscono un prodotto attivo e ben conservabile, quello di Foth e quello di Roux. Secondo Foth, le culture attive di bacillo morvoso, fatto sviluppare nell'agar glicerinata a 37°,7 C. per 10 giorni, si trapiantano nel brodo di Löffler glicerinato (4,5 %) e si lasciano per

(1) Babès, *La pénétration du bacille de la morve par la peau intacte*, Bulletin de l'Académie de médecine de Paris, 1888.

(2) Eber, *Ueber Rotzlymphe (Mallein)*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol XI, 1891, pag. 20. — *Ueber Mallein*, Berliner thierärztl. Wochenschrift, N. 50, 1892.

20 giorni nel termostato a 37°,7 C., dopodichè si fanno evaporare a 80° C., finchè son ridotte a $^1/_{10}$ del loro volume, e si filtrano. Versando questo liquido nell'alcool assoluto, si forma un precipitato fioccoso, il quale, lavato accuratamente coll' alcool e fatto poscia disseccare nel vuoto, sopra l'acido solforico, costituisce una polvere che si conserva bene ed è facilmente solubile nell'acqua, e che si inietta sottocute nei cavalli alla dose di gr. 0,1 per animale. — Il metodo di Roux consiste invece nel tenere per 4 settimane a 35° C. la cultura del bacillo specifico, molto attivo, fatta nel brodo glicerinato, nello sterilizzarla poscia a 110° C., filtrarla e concentrarla nel vuoto fino a $^1/_{10}$ del suo volume. Questa « malleina francese » ha un'azione più energica di quella tedesca, e si adopera diluita nell'acqua fenica (5 $^0/_{00}$) in proporzione di 0,25 cc. in 2 cc. di acqua fenica, da iniettarsi in una volta.

Secondo Nocard, se l'aumento di temperatura consecutivo all' iniezione oltrepassa i 2° C., il cavallo si può considerare sicuramente moccioso, e se oscilla fra 1 $^1/_2$ e 2° C. se ne può trarre lo stesso giudizio, soltanto però se l'aumento persiste per 24 ore, e se è notevole l'edema nel luogo d' innesto; se poi l'aumento è fra 1 e 1 $^1/_2$ C., il caso è soltanto sospetto, e se finalmente l'aumento è minore, non ha alcuna importanza.

8. Bacillo della difterite dell'uomo.

La vera difterite dell'uomo è una malattia a sè, caratterizzata da speciali sintomi clinici e da alterazioni patologiche speciali, per quanto esistano anche altre forme morbose che le rassomigliano, (angina scarlattinosa, ecc.).

Causa di tale malattia è uno speciale bacillo, osservato e studiato accuratamente la prima volta da Löffler (1), il quale lo ha coltivato dalle pseudomembrane difteriche in un numero considerevole di casi di difterite.

Il riserbo che mantenne Löffler nella sua prima pubblicazione riguardo al valore specifico del bacillo da lui coltivato, riserbo che aveva il suo fondamento nell'avere egli una volta osservato lo stesso bacillo nella bocca di un bambino sano, e nel non aver potuto riprodurre col suo bacillo negli animali il quadro clinico completo della difterite, si può dire oggi assolutamente eliminato per opera delle ricerche ulteriori dello stesso Löffler (2) e

(1) Mitth, a. d. kais. Ges. Vol. II, pag. 421, 1884.
(2) Löffler, *Weitere Untersuchungen über Diphterie-Bacillen*, Centralblatt f. Bacteriologie. Vol. 2, 1887, pag. 105.

di molti altri osservatori, fra i quali citiamo in prima linea Roux e Yersin (1), giacchè questi hanno non solo dimostrato la presenza costante del bacillo nella difterite, ma hanno anche riprodotto negli animali, coll'innesto delle culture e dei loro prodotti, il quadro clinico completo della malattia dell'uomo, comprese le paralisi secondarie. Oggidì adunque non esiste più alcun dubbio sul fatto che il bacillo di Löffler rappresenta il vero agente specifico della difterite.

Questo bacillo è lungo all' incirca come quello della tubercolosi, ma notevolmente più grosso; si mostra spesso leggermente incurvato e presenta un aspetto molto vario e bizzarro. Taluni bacilli infatti hanno le estremità semplicemente arrotondate, mentre altri, e anzi la maggior parte, hanno una o tutte e due le estremità rigonfiate a forma di clava (Tav. V, fig. 12). Anche l' interno del bacillo si mostra ora continuo, ed ora invece diviso in segmenti, o granuli, come il bacillo della lebbra.

Il bacillo di Löffler è immobile, e non sporigeno. Con tutto ciò resiste assai lungamente all'azione del disseccamento, a temperatura ordinaria, giacchè nelle pseudomembrane disseccate si è trovato ancora vivente dopo 5 mesi. Non è molto resistente invece all'azione dei disinfettanti chimici e della temperatura elevata: i bacilli contenuti nell'essudato membranoso resistono per più di 1 ora a 95-98°C. di calore secco, e muoiono invece rapidamente a 58° C., se allo stato umido.

Questo bacillo si trova abbondante nelle pseudomembrane difteriche, e precisamente negli strati loro superficiali: nell' interno dell'organismo si credeva prima che i bacilli non si diffondessero, mentre invece Frosch (2) ha dimostrato che il reperto dei bacilli difterici nel sangue e negli organi interni è tutt' altro che raro, avendolo egli potuto dimostrare in 10 casi su 14 osservati.

La constatazione della presenza del bacillo di Löffler nelle false membrane serve per stabilire sicuramente il diagnostico della malattia. A tal uopo si deve anzitutto praticare l'esame microscopico, ed i preparati fatti dilacerando pezzetti di membrana, o facendone sezioni, si colorano colla soluzione alcalina (Löffler) di azzurro di metilene, giacchè colle soluzioni acquose semplici dei colori di anilina i bacilli della difterite non si tingono bene.

Il metodo Gram colla soluzione Ehrlich di genziana serve anche assai bene per colorare questi bacilli.

(3) Roux e Yersin. *Contribution à l'étude de la diphtérie*, Annales de l'Institut Pasteur 1888, pag. 629, 1889 pag. 273 e 1890, pag. 385.

(4) Frosch. *Verbreitung des Diphteriebacillus im Körper des Menschen*, Zeitschrift f. Hygiene Vol. XIII, 1893, pag. 49.

Il solo esame microscopico non basta però per stabilire con certezza la diagnosi di difterite; bisogna anche fare le culture, le quali riescono facilmente, sia sul siero di sangue speciale preparato da Löffler (3 parti di siero di sangue di vitello, e 1 parte di brodo contenente 1 % di peptone, 0,5 % di cloruro sodico e 1 % di destrina) e sia sull'agar glicerinata. Quando non si abbiano pronte queste sostanze, si può adoperare invece un mezzo di nutrizione più semplice e più facile a prepararsi, quale è l'albume d'uovo coagulato e ridotto in pezzi, messi entro i tubi da saggio (1). Per ottenere le culture,si fanno strisciare coll'ago di platino piccoli pezzetti di pseudomembrana sulla superficie dei mezzi solidi di nutrizione.

Per meglio riuscire nell'intento, si può seguire il precetto indicato da Roux e Yersin, di fare strisciare su 6-8 tubi di siero, o di agar, lo stesso pezzetto di membrana, successivamente, per far si che il numero dei microrganismi depositati sulla superficie del mezzo di nutrizione divenga sempre più piccolo, finchè i bacilli difterici si trovano isolati, il che accade sicuramente nel 4.° o 6.° tubo tutt' al più. La rapidità del loro sviluppo nel siero fa sì che le colonie isolate del bacillo sieno già ben visibili dopo circa 20 ore, prima, cioè, che gli altri batterî, che costituiscono le impurità, abbiano vegetato. Si può anche, come consiglia Baginsky (2), tenere immerso il pezzetto di membrana per qualche minuto in una soluzione di borace al 2 %, prima di farlo strisciare sulla superficie del mezzo nutritivo. In tal modo si impedisce lo sviluppo degli altri microrganismi (della bocca), che accompagnano il bacillo di Löffler, diguisachè si può avere in 24 ore il bacillo in cultura netta, sotto forma di colonie bianche, rotondeggianti e più spesse nel centro, tanto sulla superficie del siero, che su quella dell'agar, o dell'albume, tenuti a 37° C. L'aspetto biancastro, lucente e rilevato di tali colonie serve a distinguerle, anche ad occhio nudo, da quelle degli altri microrganismi. Lo sviluppo è stentato nella prima generazione, e si fa sempre più rigoglioso nei trapianti successivi, mentre di pari passo diminuisce la virulenza dei bacilli.

La temperatura entro cui è possibile lo sviluppo oscilla fra 20 e 42° C. Il siero, l'agar, il brodo e la gelatina, purchè di reazione debolimente alcalina, costituiscono tutti un buon terreno di nutrizione pel bacillo di Löffler; sulle patate invece non si sviluppa.

(1) Sackharoff, *Simplification du diagnostic bactériologique de la diphtérie*, Annales de l'Institut Pasteur, 1892, pag. 451.

(2) Baginsky, *Zur Aetiologie der Diphterie — Der Löffler'sche Bacillus*, Festschrift f. Rudofph Virchow, 1891.

Nella gelatina (a 22-24°) cresce senza fluidificarla, sotto forma di piccole colonie sferiche, biancastre, lungo tutto il canale d'innesto. Si sviluppa però stentatamente, e nei preparati microscopici si osservano numerose le forme involutive, con estremità molto rigonfie ed irregolari.

Sull'agar e sul siero, nei successivi trapianti, si sviluppa sotto forma di uno strato spesso, biancastro, e a superficie lucente. In queste culture, specialmente se il mezzo è glicerinato, lo sviluppo è accompagnato da abbondante produzione di acido, nel mentre si spegne la virulenza e la vitalità del microrganismo, assai più presto però nell'agar che nel siero di sangue.

Nel brodo semplicemente alcalino la maniera di crescere del bacillo è abbastanza caratteristica, sotto forma di piccoli grumi biancastri, i quali aderiscono alle pareti del recipiente, oppure precipitano al fondo lasciando il liquido incoloro. Anche qui la reazione del mezzo si fa acida, e si mantiene sempre tale, se la cultura è fatta coi metodi anaerobici, mentre invece in presenza dell'aria la reazione dopo un certo tempo si fa di nuovo alcalina. Quando la reazione del brodo si è di nuovo fatta alcalina, la cultura ha raggiunto il grado massimo di virulenza. La virulenza delle culture fatte nel brodo semplicemente alcalino si conserva molto più lungamente che quella delle culture fatte nell'agar e negli altri mezzi glicerinati.

Il latte sterilizzato costituisce pure un eccellente mezzo di nutrizione pel bacillo di Löffler.

Esso è anaerobio facoltativo, ma lungi dal contatto dell'aria cresce meno rigogliosamente che nelle culture aerobiche.

Questo bacillo, coltivato dalle membrane difteriche, si mostra sempre virulento per gli animali capaci di subire la sua azione. Di questi viene in prima linea la cavia; segue poscia il coniglio, il colombo ed il pollo. Le diverse razze di topi invece si mostrano refrattarie.

Se l'innesto della cultura si fa nella cavia sottocute, l'animale muore in 24-48 ore con fenomeni di reazione locale molto intensa, sotto forma di essudato biancastro, pseudomembranoso, nel luogo dell'innesto e di edema gelatinoso ed emorragico del tessuto sottocutaneo circostante, e con fenomeni di dilatazione generale dei vasi sanguigni, che si manifesta sotto forma di congestione degli organi interni, e specialmente delle capsule surrenali. Si aggiunge a ciò, quasi sempre nelle cavie e raramente invece nel coniglio, versamento sieroso nelle cavità pleuriche e indurimento lobulare dei polmoni.

Negli animali inoculati i bacilli si trovano, per lo più, soltanto attorno al luogo d'innesto, e solo raramente nel sangue e negli organi interni.

L'innesto delle culture pure fatto sulla superficie delle mucose escoriate delle cavie, dei conigli, dei colombi e dei polli è seguito da formazione di pseudomembrane tipiche, come quelle dell'uomo. Brieger e Fränkel (1) sono riesciti anche a riprodurre una vera difterite coll'innesto delle culture nella trachea della cavia e del coniglio. In questo ultimo animale il decorso della malattia è assai più lungo (qualche giorno e talvolta anche qualche settimana) ed accompagnato quindi da fenomeni generali, i quali si manifestano anche nella cavia e nel colombo, ma più raramente. Tali sono l'albuminuria da nefrite (2) e le paralisi, le quali talora si manifestano acutamente nel decorso dell'infezione, ma più spesso invece tardivamente, come nell'uomo; e ciò specialmente se l'innesto è fatto sottocute. La paralisi colpisce nei conigli di preferenza gli arti posteriori, e può avere un decorso progressivo, oppure anche andare a guarigione.

I fenomeni morbosi, che si sviluppano negli animali coll'innesto della cultura del bacillo difterico, sono alquanto diversi nei singoli casi, a seconda del grado di virulenza che esso ha originariamente.

Il bacillo specifico si mostra infatti in generale più o meno virulento, secondo la gravità del caso, ed anche secondo il periodo della malattia. Roux e Yersin hanno osservato che, quando la difterite andava a guarigione, i bacilli perdevano anche gradatamente la loro virulenza.

I fenomeni morbosi generali, assai gravi, di tale malattia si devono all'azione di sostanze velenose, elaborate dai bacilli nel loro sviluppo. Questo fatto, che si poteva già desumere dall'essere i bacilli prevalentemente annidati nelle manifestazioni locali della malattia, è stato anche provato sperimentalmente da Roux e Yersin, i quali hanno dimostrato che il filtrato amicrobico di culture del bacillo fatte nel brodo, piuttosto vecchie e con reazione alcalina, è fortemente velenoso per gli animali, e riproduce in questi gli stessi fenomeni morbosi che le culture attive del bacillo. Col filtrato delle culture non si riproducono le pseudomembrane sulle mucose, ma si ha sottocute l'edema emorragico e talvolta anche

(1) Brieger e Fränkel, *Untersuchungen über Bacteriengifte*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 11, 1890.

(2) Spronck, *Zur Kenntniss der pathogenen Bedeutung des Diphteriebacillus* Centralblatt f. allgem. Pathol. u. path. Anat. N.° 7, 1890.

l'essudazione sierosa nelle cavità pleurali; se poi la dose iniettata è debole, si ha spesso negli animali la riproduzione di paralisi difteriche, tipiche.

La sostanza attiva delle culture, secondo Roux e Yersin, possiede le proprietà dei fermenti organici. Essa infatti precipita dai liquidi che la contengono insieme ai precipitati finamente granulosi, che in essi si producono (fosfato di calce), e diventa rapidamente inattiva sotto l'azione della temperatura superiore ai 55° C., come per l'aggiunta di piccole quantità di acidi organici.

Evaporando il filtrato di culture virulente nel vuoto, a 25° C., in presenza dell'acido solforico, si ottiene un residuo facilmente solubile nell'acqua ed altamente velenoso. L'alcool invece scioglie soltanto una piccola quantità di quel residuo, e l'estratto riesce affatto inattivo. Il veleno difterico è adunque, come i fermenti, insolubile nell'alcool, e può da questo venir precipitato nelle soluzioni acquose.

Brieger e Fränkel hanno invece estratto dal filtrato delle culture una sostanza velenosa, avente i caratteri chimici degli albuminoidi, e appartenente perciò alle « tossialbumine ». Questa sostanza ha però un grado di velenosità molto inferiore di quella isolata da Roux e Yersin; il che fa ritenere probabile l'opinione emessa da Wassermann e Proskauer (1), che, cioè, la tossialbumina di Brieger e Fränkel rappresenti una parte del virus difterico, ma non tutto, e che questo sia costituito non da un'unica sostanza, ma da parecchie sostanze, dotate di azione velenosa. Si aggiunga a ciò che il veleno difterico si forma anche in mezzi affatto privi di sostanze albuminoidi (2).

Coll'iniezione del filtrato delle culture non si è finora riuscito a produrre negli animali uno stato di immunità verso i bacilli virulenti. Fränkel (3) è riescito invece iniettando sottocute nelle cavie 15-20 cc. di cultura del bacillo, di 3 settimane di data, riscaldata per un'ora a 65°-70° C. L'immunità però non si produce subito, ma gradatamente; giacchè le cavie, così trattate, resistono all'innesto del bacillo virulento soltanto allorchè questo sia fatto 14 giorni dopo l'iniezione preventiva.

Behring (4) ha ottenuto lo stesso risultato nelle cavie, non solo

(1) Wassermann u. Proskauer, *Ueber die von Diphteriebacillen erzeugten Toxialbumine,* Deutsche med. Wochenschr. N.° 17, 1891.

(2) Guinochet, *Contribution à l'étude de la toxine du bacille de la diphtérie.* Arch. de méd. expér. T. IV, 1892.

(3) Fränkel, *Immunisirungsversuche bei Diphterie*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 49, 1890.

(4) Behring, *Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphterieimmunität bei Thieren*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 50, 1890.

col metodo di Fränkel, ma anche iniettando culture a cui si è aggiunto da 16 ore tricloruro di jodio in proporzione di 1 : 500, oppure il liquido sieroso che si trova nella cavità pleurica degli animali morti per innesto di virus difterico. Lo stesso Behring (1) è riuscito in seguito a rendere immuni gli animali anche con altri mezzi, dimostrando in pari tempo, come si è già detto in altro luogo, il potere immunizzante e curativo che ha per l'infezione difterica sperimentale il siero sanguigno degli animali, resi immuni. Dietro tali esperimenti lo stesso Behring ha tentato anche la cura della difterite nell'uomo (2), usando il siero sanguigno di pecora e di cane, resi immuni, dopo aver dimostrato che le iniezioni sottocutanee di questo siero sono altrettanto inoffensive per l'uomo, che quelle di una soluzione fisiologica di cloruro sodico. I casi finora curati in tal guisa ascendono a 30, e di questi 24 ebbero un esito favorevole.

Behring fa osservare giustamente, che le iniezioni di siero antidifterico non servono che a combattere l'infezione da bacillo della difterite, e non le sue complicazioni, di cui la più frequente e la più grave è quella dovuta agli streptococchi.

Aggiungiamo a questo proposito che non è ancora ben precisato qual parte spetti nella malattia agli streptococchi, i quali si trovano quasi costantemente, insieme al bacillo di Löffler, nelle pseudomembrane, ed ai quali anzi si era da taluni (Prudden) persino attribuito il compito principale nella produzione di essa. È molto probabile che tali microrganismi favoriscano l'azione del bacillo difterico, giacchè Roux e Yersin (3) hanno provato che la virulenza di questo si rinforza, allorquando viene iniettato negli animali insieme allo streptococco piogeno, e Schreider (4) ha non solo confermato questo fatto, ma ha anche trovato che nelle culture miste dei due microrganismi si formano sostanze, precipitabili coll'alcool, dotate di un potere tossico maggiore di quelle ottenute dalle culture isolate di ciascuno di quelli. Oltre a ciò, nella così detta « difterite scarlattinosa » non si trovano nelle pseudomembrane i bacilli di Löffler, ma soltanto gli streptococchi. Anche questi adunque possono dar luogo alla produzione di membrane crupose, senza aver nulla a che fare colla vera difterite.

(1) Behring u. Wernicke, *Ueber Immunisirung und Heilung von Versuchsthieren bei der Diphterie*, Zeitschrift f. Hygiene, XII, 1892, pag. 10.

(2) Behring, Boer und Kossel, *Zur Behandlung diphteriekranker Menschen mit Diptherieheilserum*, Deutsche med. Wochenschrift, N.°, 17, 18 e 23, 1893.

(3) Annales de l'Institut Pasteur, IV, 1890, pag. 423.

(4) Schreider, *Ueber Mischkulturen von Streptokokken und den Diphteriebacillen*, Centralblatt f. Bacteriologie, XII, 1892, pag. 289.

Nella bocca di persone sane Löffler ha osservato pel primo un bacillo di forma affatto simile a quello della difterite, ma non virulento, e che ha perciò distinto col nome di « bacillo pseudodifterico ». Questo microrganismo si trova abbastanza frequentemente anche nella bocca delle persone sane (Roux e Yersin lo hanno riscontrato 48 volte su 117) e nella congiuntiva oculare (Uhthoff); e non è ancora deciso se debba riguardarsi come una specie distinta, come ritengono alcuni (Hoffmann (1), Escherich (2)), o se invece sia lo stesso bacillo della difterite, privo di virulenza, come sostiene Fränkel (3), e come ritengono anche Roux e Yersin, i quali hanno osservato che anche nei casi gravi di difterite, accanto alle colonie fortemente virulente del bacillo, se ne trovano altre, poco o niente attive, e che il numero di queste si fa sempre più grande, allorquando il caso va a guarigione.

Affezioni difteriche, simili a quelle dell'uomo, si verificano anche nei polli (pepita), nei colombi, nel bue e nel coniglio; ma tali forme sono tutte dovute a microrganismi diversi da quelli della difterite dell'uomo, come lo hanno provato le ricerche di Löffler, di Pfeiffer (4) e di Ribbert (5).

9. Bacillo del tifo addominale.

Sotto il nome di « bacillo del tifo » intendiamo oggi un bacillo, osservato per la prima volta nei tessuti dei tifosi da Eberth (6) e da Koch (7), e coltivato poscia e studiato nel 1884 da Gaffky (8), il quale ha potuto con numerose osservazioni stabilire fin d'allora il rapporto eziologico esistente fra il bacillo e la malattia in cui si riscontra. — Il bacillo del tifo è corto (2-3 μ. in media) e grosso, ha le estremità arrotondate, e si presenta nei tessuti per lo più isolato, o riunito a due, mentre nelle culture, specialmente nel brodo e sulle patate, forma anche filamenti abbastanza lunghi (Tav. VI fig. 8).

(1) Hoffmann, *Untersuchungen über den Löffler' schen Bacillus der Diphterie und seine pathogene Bedeutung*. Wiener med. Wochenschr. N.° 3 e 4, 1888.

(2) Escherich, *Zur Frage des Pseudodiphteriebacillus*. Berl. klin. Wochenschr. N.° 21, 22 e 23, 1893.

(3) Fränkel, *Ueber das Vorkommen des Löffler'schen Diphteriebacillus*, Berl. klin. Wochenschr. 1893, pag. 252.

(4) Pfeiffer, *Die Protozöen als Krankheitserreger*, Jena, 1890.

(5) Ribbert, *Ueber einen bei Kaninchen gefundenen pathogenen Spaltpilz (Bacillus der Darmdiphterie der Kaninchen)*, Deutsche med Wochenschr. N.° 8, 1887.

(6) Eberth, *Die Organismen in den Organen bei Typhus abdominalis*, Virchow's Archiv. Vol. 81, 1880 e Vol. 83, 1881.

(7) Mitth. a. d kais. Ges. Vol. I, pag. 45.

(8) Gaffky, *Zur Aetiologie des Abdominaltyphus*, Mitth a. d. kais. Ges. Vol. II, p. 372.

È dotato di movimenti proprî, assai vivaci, che si osservano facilmente nelle goccie pendenti, tanto nei bacilli isolati, come nei filamenti. Corrispondentemente a ciò, i bacilli si trovano provvisti di ciglia numerose, situate lateralmente, e che si mettono bene in evidenza col metodo Löffler, aggiungendo 1 cc. di soluzione di idrato sodico (1 %) ai 16 cc. di liquido mordente.

Il bacillo del tifo non è sporigeno, come ha dimostrato indubbiamente Buchner (1) contro l'opinione di Gaffky, il quale avea ammesso l'esistenza delle spore nei bacilli coltivati a 37° C., specialmente perchè questi, trattati coi colori d'anilina, appaiono colorati alle estremità, con uno spazio centrale incoloro, ed anche perchè si mostrano assai resistenti all'azione del disseccamento, potendosi mantenere viventi per parecchi mesi, secondo Schiller (2) persino due anni, disseccati sui fili di seta.

Questi bacilli però sono assai poco resistenti all'azione del calore, giacchè basta la temperatura di 60° C. per ucciderli in 10 minuti circa.

Si colorano bene cogli ordinarî colori d'anilina, ma perdono anche facilmente il loro colore sotto l'azione dei reattivi decoloranti, anche leggeri (alcool, acqua acidulata). Non si può quindi ottenere nei tessuti una colorazione doppia. Il miglior mezzo per colorarli è la soluzione di azzurro di metilene, di Kühne o di Löffler, e la soluzione Ziehl di fucsina, che fa spiccare assai bene la parte centrale del bacillo, non colorata. — Il metodo Gram non li colora.

Un metodo che serve anche bene per la colorazione del bacillo del tifo nei tessuti, è quello proposto da Nicolle (3) pei microrganismi che non si colorano col metodo di Gram, e che consiste nel tenere immerse le sezioni per tre minuti nell'azzurro di metilene, lavarle con acqua, oppure con una soluzione tenue di acido acetico, immergerle per pochi istanti in una soluzione di acido tannico (1 su 10 di acqua), lavare di nuovo con acqua, disidratare coll'alcool assoluto, rischiarare coll'olio di bergamotto, e chiudere nel balsamo. I bacilli appaiono colorati più intensamente che gli elementi del tessuto.

Si sviluppano facilmente negli ordinarî mezzi di nutrizione, alla temperatura ordinaria dell'ambiente, come a 37°, e fino anche a 45° C. Possono crescere anche lungi dall'O atmosferico, ma lo sviluppo è molto più rigoglioso in presenza dell'aria.

(1) Buchner, *Ueber die vermeintlichen Sporen der Typhusbacillen*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 4.°, 1888, pag. 353 e 385.

(2) Schiller, *Beitrag zum Wachsthum der Typhusbacillen auf Kartoffeln*, Arbeiten a. d. kaiserl. Gesundheitsamt, Vol. V, 1889, p. 312.

(3) Nicolle, *Méthode de recherche des microrganismes qui ne se colorent pas par le procédé de Gram*, Annales de l'Institut Pasteur, 1892, pag. 783.

Nella gelatina il bacillo del tifo cresce, senza fluidificarla e senza dar luogo a sviluppo di gas, sia lungo il canale d'innesto, come anche, e più specialmente, sulla superficie, sotto forma di uno straterello sottile, bianco-grigiastro, iridescente, a margini irregolarmente frastagliati. Nelle culture isolanti le piccole colonie, osservate al microscopio, se situate nello spessore della gelatina appaiono come ammassi tondeggianti, giallastri, finamente granulosi e a contorni netti, e se superficiali, appaiono invece come uno straterello sottile, ondeggiato, semitrasparente e a margini frastagliati. Quest'aspetto però non è caratteristico del bacillo tifoso, ma comune anche ad altri microrganismi.

La gelatina non viene mai fluidificata, ma diventa spesso leggermente torbida tutto attorno alla colonia del bacillo, per opera degli acidi che questo produce.

Sul siero di sangue e sull'agar produce uno strato biancastro, che ha nulla di speciale. Nel latte sterilizzato cresce rigogliosamente, senza alterarne l'aspetto e senza coagularlo.

Più caratteristico è il modo di crescere del bacillo sulla superficie delle patate cotte, ed è importante a descriversi, perchè questo carattere, segnalato già nei primi studî da Gaffky, serve anche oggidì per la diagnosi differenziale del bacillo del tifo, giacchè, all'infuori del *B. coli*, il quale può talvolta offrire lo stesso aspetto (Dunbar), non si conoscono altri microrganismi che offrano la stessa maniera di crescere sulle patate che quelli del tifo. La specialità consiste in ciò, che la superficie delle patate infette, dopo due giorni se a 37°, e dopo quattro giorni se alla temperatura dell'ambiente, appare tutta quanta splendente, come fosse bagnata, senza che vi sia altro segno che indichi lo sviluppo dei bacilli seminativi. Se però si striscia sulla patata coll'ago di platino, si avverte una certa resistenza, come se su quella esistesse una membranella, e coll'ago si esporta infatti un materiale, che esaminato al microscopio, sia colle goccie pendenti, sia coi preparati sui copreggetti, si mostra composto da una miriade di bacilli mobili, isolati o riuniti in filamenti. Questo aspetto caratteristico delle culture sulle patate si ottiene meglio alla temperatura dell'ambiente, che non a 37° C., sia perchè lo sviluppo è più rigoglioso, e sia perchè la reazione delle patate esercita minore influenza sull'aspetto della cultura.

Si è trovato difatti che l'apparenza sopradescritta non si riproduce in tutte le qualità di patate, ma soltanto in quelle ordinarie a reazione leggermente acida; cosicchè, può accadere talvolta che anche i bacilli del tifo formino sulle patate uno strato di colorito giallastro, simile a quello di altri microrganismi.

Si è cercato perciò da molti di scoprire qualche altro segno differenziale che servisse a distinguere sicuramente questo bacillo dalle molte altre forme consimili (« tifo-simili » dei tedeschi), che si possono trovare con essi nelle feci o nelle acque, dove in molti casi riescirebbe molto importante il potere stabilire con certezza la presenza dei bacilli del tifo. Esporremo qui i principali di questi metodi; e ciò avrà specialmente il vantaggio di porre in guardia i futuri ricercatori, e di evitare loro perdite di tempo ed errori, giacchè si può dire lo stesso di tutti quanti questi metodi presi insieme, e cioè, che dapprincipio fu ciascuno di essi vantato come buono e sicuro, ma che in seguito furono tutti dimostrati, qual più, qual meno, inesatti od insufficienti.

Kitasato (1) ha proposto un mezzo differenziale che consiste nella *reazione negativa dell'indolo* nelle culture in brodo di bacillo tifoso. Ecco come si fa la prova. A 10 cc. di cultura in brodo alcalino, peptonizzato, tenuto a 37° C. per 24 ore, si aggiunge 1 cc. di soluzione di *nitrito potassico* a 0,02 % e alcune goccie di acido solforico concentrato. Se si tratta di veri bacilli tifosi, *non appare nel liquido alcuna colorazione*, perchè essi non producono nè indolo, nè scatolo; mentre invece molti altri bacilli, simili a quelli del tifo, producono indolo, ed in tal caso per l'aggiunta del nitrito potassico e dell'ac. solforico la cultura in brodo prende una tinta rosea, o rosso-scura. Questo mezzo però non serve a distinguere il bacillo del tifo dal *B.coli*, nel quale si ha pure la reazione negativa dell' indolo.

Altri mezzi diagnostici differenziali si fondano sulla proprietà, che ha il bacillo del tifo di svilupparsi ancora, ad una temperatura più elevata (40-45° C) che i batterî acquatili, e di crescere anche in mezzi acidificati con una tale proporzione di acido fenico, la quale serve ad impedire lo sviluppo degli altri germi che sono ad esso commisti. Così Rodet (2) ha fatto le culture dell'acqua sospetta nel brodo comune, tenendole a 45°, Chantemesse e Vidal (3) hanno proposto di fare le culture isolanti con gelatina a cui si è aggiunto acido fenico in proporzione di 0,25 %, e Thoinot (4) ha consigliato invece di aggiungere l'acido fenico all'acqua (20 goccie per ogni mezzo litro) qualche ora prima di farne le culture.

Vincent (5) ha poi messo a profitto quei due fatti in un metodo unico, servendosi del brodo fenicato (1 goccia di soluzione fenica al 5 % per ogni 2 cc. di brodo) e facendo in questo culture dell'acqua (5 a 15 goccie) a 42° C. Egli dice che trasportando un'ansa di platino delle culture nelle quali si nota intorbidamento in nuovi tubi di brodo fenicato, e tenendoli sempre a 42° C., per 2-5 volte consecutive, si finisce coll'ottenere una cultura pura del bacillo del tifo.

Parietti (6) ha cercato di perfezionare il metodo dei brodi fenicati, pre-

(1) Kitasato, *Die negative Indol-reaction der Typhusbacillen*, ecc. Zeitschr. f. Hygiene, Vol 7, 1889, pag. 515.

(2) Rodet, *De l'importance de la température*, ecc. Comptes rendus de la soc. de biol. N.° 26, 1889.

(3) Chantemesse et Vidal, *Recherches sur le bacille typhique et l'étiologie de la fièvre typhoide*, Archives de Phys. norm. e path. N.° 2, 1887.

(4) Thoinot, *Sur la presence du bacille*, ecc. Semaine médicale, 1887, N.° 14.

(5) Vincent, *Sur un nouveau procédè d'isolement du bacille typhique dans l'eau*, Comptes rendus de la Soc. de biol. N.° 5, 1890.

(6) Parietti, *Metodo di ricerca del bacillo del tifo nelle acque potabili*, ecc. Rivista d'igiene e sanità pubblica, N.° 11, 1890.

parando tre serie di questi brodi: una 1.ª serie in cui a 10 cc. di brodo si aggiungono 3 goccie di soluzione di fenolo al 5 %, acidulata con HCl al 4 %; una 2.ª serie in cui a 10 cc di brodo si aggiungono 6 goccie di soluzione acida di fenolo, ed una 3.ª serie in cui se ne aggiungono 9 goccie. Le goccie sono contate con una siringa Pravaz, priva di cannula, e ognuna di esse corrisponde a circa $^1/_{30}$ di cc. Si prendono di ciascuna serie 10 provette, vi si lasciano cadere con una pipetta sterilizzata da 1 a 10 goccie d'acqua sospetta, e si tengono a 37° C. Dai tubi nei quali si ha intorbidamento si praticano le culture isolanti nella gelatina comune, per vedere se vi è il bacillo del tifo.

Questo metodo, provato da Parietti nelle acque artificialmente inquinate con culture di bacillo del tifo, avrebbe anche dato buoni risultati in quelle inquinate naturalmente, giusta le ricerche di Monti (1), di Sormani (2) e di Kamen (3).

Tutti questi metodi però non permettono di differenziare il bacillo tifoso dal *B. coli*, il quale si mostra più resistente del primo, tanto all'azione dell'acido fenico, come a quella degli altri agenti nocivi.

Un altro mezzo differenziale è stato proposto da Holz (4) colle culture isolanti nella gelatina preparata col succo di patate crude, come segue: lavate e sbucciate, le patate si sminuzzano e se ne spreme il succo attraverso un pannolino; questo succo si fa cuocere per $^1/_2$ ora nel vapor d'acqua a 100° C., si filtra di nuovo, vi si aggiunge gelatina in proporzione del 10 %, si cuoce nel vapor d'acqua per $^3/_4$ d'ora, si filtra, si distribuisce nei tubi da saggio e si sterilizza, come al solito. Holz consiglia in pari tempo di aggiungere all'acqua 0,05 % di fenolo, giusta i precetti di Thoinot, prima di fare con essa le culture isolanti nella gelatina acida di patate. Una tale gelatina è poco favorevole per lo sviluppo degli altri batterî, mentre quelli del tifo vi vegetano rigogliosamente sotto forma di colonie giallo-brune, se profonde, e trasparenti e leggermente iridescenti, se superficiali. Anche il *B. coli* vegeta però nella gelatina di Holz, come il bacillo del tifo.

Finalmente resta ancora a parlare dei *mezzi di nutrizione colorati*, proposti anch'essi come mezzo diagnostico differenziale del bacillo del tifo, sia usando la miscela di sostanze coloranti proposta da Noeggerath (5), e sia adoperando soltanto uno o l'altro dei colori di anilina. La colorazione dei mezzi solidi e liquidi colla miscela di Nöggerath, che risulta composta di soluzioni acquose concentrate di azzurro di metilene (2 cc.), di violetto di genziana (4 cc.), di verde di metile (1 cc.), di crisoidina (4 cc.), di fucsina (3 cc.) e di 200 cc. di acqua distillata, è stata adoperata da Grancher e Dechamps (6), i quali hanno detto che le colonie dei bacilli del tifo, sviluppate nei mezzi solidi o liquidi colorati con quella miscela, si colorano in violetto, decolorando il mezzo nutritivo circostante; e ciò in modo diverso da quello che facciano altri microrganismi consimili.

Ciò però non è stato confermato da Holz, il quale, ripetendo le osservazioni di Grancher e Dechamps, ha osservato che il fenomeno da loro descritto

(1) Monti, *I bacilli del tifo nelle acque potabili della città di Pavia*, Rivista d'igiene e sanità pubblica. N.° 17, 1891.

(2) Sormani, *Dimostrazione del bacillo di Eberth nelle acque potabili di Pisa*, Rivista d'igiene e sanità pubblica, N.° 23, 1891.

(3) Kamen, *Zum Nachweise der Typhusbacillen im Trinkwasser*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol 11, 1892 pag. 33.

(4) Holz, *Experimentelle Untersuchungen über den Nachweis der Typhusbacillen*, Zeitschr. f. Hygiene. Vol. 8. 1890, pag. 543.

(5) V. Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 3, 1888, pag. 481.

(6) Grancher et Dechamps, *Recherches du bacille typhique dans le sol*, Archives de méd. expér. e d'anat. pathol. 1889.

come caratteristico dello sviluppo del bacillo tifoso è tutt'altro che costante, e può variare notevolmente a seconda della reazione del mezzo.

Gasser (1) propone invece di colorare semplicemente l'agar colla fucsina (20 goccie di soluzione acquosa concentrata per ogni tubo d'agar), di versarla nelle scatole di Petri e di farvi su l'innesto a stria dei bacilli sospetti. Tenendo la cultura a 37°, se si tratta di bacillo del tifo, la colonia si colora in rosso-scuro e l'agar si decolora in modo, che in 7-8 giorni è completamente incolora. Anche questo mezzo è però malfido, perchè altri microrganismi, e fra questi il *B. coli*, si comportano egualmente che quello del tifo.

Uffelmann (2) finalmente ha messo a profitto in un nuovo metodo differenziale i due fatti, del crescere il bacillo del tifo anche in mezzi acidi e del colorarsi della colonia nei mezzi colorati. Egli prepara una *gelatina acida, colorata col violetto di metile*, acidificando la gelatina alcalina, ordinaria, con acido citrico, in modo che 10 cc. di gelatina restino esattamente neutralizzati da 14 cc. di una soluzione di 5,3 di carbonato sodico in 1000 di acqua. Questa gelatina si filtra e vi si aggiunge per ogni 100 cc. mmgr. 2,5 di violetto di metile, sciolto in 1 goccia d'alcool assoluto e 1 cc. di acqua distillata. La gelatina distribuita nei tubi si sterilizza nel vapor d'acqua a 100° per 15 minuti.

Secondo Uffelmann soltanto un piccolissimo numero di altri microrganismi, oltre quelli del tifo, crescono in tale gelatina, ed oltre a ciò questi ultimi vi si sviluppano in maniera caratteristica, sotto forma di colonie tondeggianti od oblunghe, visibili già dopo 24 ore (a 20°-21° C.), le quali, chiare dapprima, si colorano in seguito in violetto molto più intenso del colorito della gelatina. Egli afferma di aver due volte scoperto con tal mezzo i bacilli del tifo nelle acque, e di aver potuto constatare la loro presenza nelle feci infette dopo 4 mesi.

Uffelmann aveva dimostrato che i metodi di Chantemesse, di Vincent, di Gasser, di Parietti, di Holz, erano tutti insufficienti per lo scopo, e Dunbar (3) a sua volta ha dimostrato che anche il metodo di Uffelmann è, su per giù, difettoso come gli altri, giacchè il *B. coli* cresce sulla gelatina acida colorata col violetto di metile cogli stessi caratteri del bacillo del tifo.

Secondo Dunbar, i soli criterî, valevoli a differenziare il bacillo del tifo dal *B. coli*, sarebbero due:

1.° Lo sviluppo nel latte sterilizzato, nel quale il bacillo del tifo cresce rigogliosamente, producendo poco acido e senza mai coagulare il latte; mentre invece il *B. coli* vi produce molto acido e ne opera la coagulazione dopo 24-48 ore.

2.° La nessuna produzione di gas per opera del bacillo del tifo fatto sviluppare nel brodo di carne semplice (senza alcuna aggiunta, nè di peptone, nè di sale) a 37° C., e la produzione abbondante di gas, invece, per opera del *B. coli* fatto sviluppare nelle stesse condizioni.

Essendo così dimostrato che nessuno dei metodi finora proposti serve a differenziare sicuramente il bacillo del tifo dal *B. coli*, è logico ammettere che in tutti i casi in cui si è creduto finora di avere isolato il bacillo del tifo dalle acque sospette di aver diffuso la malattia, non è escluso il dubbio di uno scambio col *B. coli*, il

(1) Gasser, *Culture du bacille typhique sur les milieux nutritifs colorés*, Archives de méd. expér. et d'anat. pathol. N.° 6, 1890.

(2) Uffelmann, *Ueber den Nachweis der Typhusbacillen*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 35, 1891.

(3) Dunbar, *Ueber den Typhusbacillus und den Bacillus coli communis*, Zeitschrift f. Hygiene, Vol. 12, 1892, pag. 485.

quale, trovandosi sempre nel contenuto intestinale, deve necessariamente trovarsi anche nell'acqua che resta inquinata col bacillo del tifo, giacchè questo viene appunto eliminato colle feci e colle orine degli infermi. Qualora però si debba accettare l'opinione, la quale del resto pare vada sempre più guadagnando terreno, che i due bacilli sieno una cosa sola, allora naturalmente il reperto dell'una o dell' altra varietà avrebbe lo stesso significato e la stessa importanza.

Dalle culture di bacillo tifoso sono state isolate due sostanze velenose, delle quali una appartenente al gruppo delle tossine (tifotossina di Brieger) e l'altra a quello delle tossialbumine (Brieger e Fränkel). È a tali sostanze che si deve essenzialmente l'azione patogena del bacillo per l'organismo animale, giacchè in questo l'iniezione del filtrato delle culture produce le stesse alterazioni patologiche che si hanno coll'innesto dei bacilli.

Se si inietta infatti nelle vene di un coniglio un'emulsione di bacilli tifosi, l'animale muore in 24-48 ore, e alla necroscopia si trovano per lo più ingrossati la milza, le ghiandole mesenteriche, i follicoli solitarî e le placche di Peyer nell'intestino, e quivi la mucosa si trova in istato di infiammazione acuta. In tutte queste parti si rinvengono pure abbondanti i bacilli inoculati.

Ma le stesse alterazioni si osservano anche, come si è detto, in seguito all'iniezione delle culture in brodo sterilizzate, per cui da molti (Fränkel, Baumgarten) si ritiene che una vera e propria infezione tifosa negli animali coll' innesto dei bacilli tifosi non si riproduca, e che si tratti invece in tali esperimenti di una semplice e pura intossicazione.

Alcuni sperimentatori però (Chantemesse e Vidal, Gilbert e Girode, Sanarelli, Bruschettini) hanno ottenuto coll'innesto dei bacilli del tifo negli animali la riproduzione di un quadro morboso, veramente infettivo, e simile a quello che si osserva nell'uomo, e questi sostengono quindi che il bacillo del tifo sia realmente infettante anche per gli animali.

Probabilmente e gli uni e gli altri hanno ragione egualmente giacchè si è trovato che il bacillo tifoso può essere dotato di un grado di virulenza molto diverso, e che la sua virulenza può anche venire esaltata o diminuita sperimentalmente. Oltre a ciò, la facile possibilità di uno scambio col *B. coli* può anch'essa renderci ragione della diversità dei risultati ottenuti dai diversi sperimentatori sul potere patogeno di questo microrganismo.

Del resto, anche se negli animali non si fosse riuscito a riprodurre la forma morbosa coll'innesto dei bacilli, ciò non basterebbe ad infirmare il loro valore specifico per la malattia dell'uomo, sia perchè l'essere essi più patogeni per l'uomo che per gli animali servirebbe già a spiegare l'esito degli esperimenti fatti in questi ultimi, e sia specialmente perchè tali bacilli si son trovati finora esclusivamente nel tifo addominale, ed in tal numero e distribuzione, da renderci bene ragione delle alterazioni anatomiche speciali della malattia.

Più difficile a risolversi è invece l'altro dubbio, già sopra espresso, il quale fu emesso la prima volta da Rodet e da Roux (1), che, cioè, il bacillo del tifo non sia altro che una varietà biologica del *bacillus coli communis*, che si trova come ospite ordinario nel nostro intestino, risultante da una modificazione (degenerazione incipiente) che quest'ultimo subisce, attraversando l'organismo umano. La trasformazione del *bac. coli* in bacillo del tifo si otterrebbe anche col riscaldamento a 80° C., coll'aggiunta di antisettici e coll'invecchiamento delle culture.

Non potendo qui riferire il molto che si è scritto finora *pro* e *contra* in siffatta questione, giacchè molti osservatori hanno cercato di dimostrare che esistono differenze morfologiche e fisio-chimiche rilevanti fra i due bacilli, mentre altri invece sostengono il contrario, citiamo soltanto un fatto importante, che aggiunge molto peso all'opinione degli osservatori francesi, e che è stato messo in luce recentemente da Cesaris-Demel e Orlandi (2), i quali avrebbero trovato che i prodotti biochimici dei due microrganismi sono equivalenti, inquantochè servono reciprocamente a rendere immuni le cavie verso l'uno o verso l'altro bacillo, ed il siero degli animali immunizzati ha proprietà terapeutiche e preventive per l'una o per l'altra infezione, reciprocamente.

Però, anche se venisse definitivamente dimostrata l'identità del bacillo di Escherich con quello di Eberth, non ne sarebbe affatto menomata l'importanza patogenica di quest'ultimo pel tifo addominale; resterebbe soltanto a determinare, con maggior precisione, in quali condizioni e per quali cause può lo stesso microrganismo, che si trova abitualmente nel nostro intestino senza recar danno, produrre ora i fenomeni del tifo addominale ed ora invece altre forme morbose (colera nostrano, infezione generale pioemica, ecc.).

(1) Soc. des sciences méd. de Lyon, Nov. 1889, — Rodet et Roux, *Bacille d'Eberth et bacillus coli*, Archives de Méd. expérim., 1892, pag, 317.

(2) Cesaris-Demel e Orlandi, *Contributo allo studio sull'equivalenza biologica dei prodotti del « Bacterium coli » e del « Bacillus typhi »*. Gazzetta medica di Torino, N.° 11, 1893.

Dal punto di vista pratico poi un tal fatto ha importanza per l'esame delle acque, giacchè basterà constatare in esse la presenza del *bac. coli*, perchè si debbano senz' altro dichiarare insalubri e pericolose.

L'immunità, che lascia generalmente nell'uomo un primo attacco della malattia, è stata anche riprodotta artificialmente negli animali, e si può ottenere facilmente mediante l'iniezione delle culture sterilizzate (1). Il siero degli animali così immunizzati possiede anch'esso proprietà immunizzanti, ed anche terapeutiche, per l'infezione tifosa sperimentale, del pari che il siero dell'uomo, guarito dell'infezione spontanea, naturale (Chantemesse e Vidal (2)). Secondo questi osservatori però, la sieroterapia del tifo addominale, tentata nell'uomo col siero sanguigno di animali resi immuni, non ha dato finora risultati soddisfacenti.

Nell'organismo umano le localizzazioni ordinarie della malattia si verificano, come dice il suo nome, negli organi contenuti nell'addome e principalmente nell' ileo e nella parte superiore del cieco, dove si manifesta dapprima una forte tumefazione dei follicoli solitarî e delle placche di Peyer, la cui superficie in seguito cade in necrosi, formandosi così le ulceri tifose. Oltre a ciò la milza e le ghiandole mesenteriche si tumefanno, restando il fegato ed il rene di aspetto normale.

I bacilli si trovano distribuiti ad ammassi (Tav. VI, Fig. 9) ed irregolarmente nei tessuti, e sono abbondanti nelle placche e nei follicoli solitarî, tumefatti e non ulcerati, e nelle ghiandole mesenteriche tumefatte: si osservano pure nello spessore delle pareti intestinali al di sotto delle ulceri, nella milza, nel fegato, e spesso anche nel rene. Nella milza e nel fegato è necessario per lo più preparare ed osservare parecchie sezioni, prima di trovare qualche gruppo di bacilli; per cui da taluno si è consigliato di tenere questi organi, per 2-3 giorni, avvolti in pannolino bagnato di sublimato, alla temperatura dell'ambiente, perchè i bacilli vi si moltiplichino. In tal modo resta più facile non solo l'osservazione microscopica, ma anche la cultura di quelli dall'interno degli organi stessi.

La ricerca dei bacilli nelle sezioni deve farsi prima con un obbiettivo debole, per iscoprire gli accumuli di essi sotto forma

(1) Sanarelli, *Études sur la fièvre typhoïde expérimentale*, Annales de l'Institut Pasteur, 1892, pag. 721.

(2) Chantemesse et Vidal, *Étude expérimental sur l'exaltation, l'immunisation et la thérapeutique de l'infection typhique*, Ibid., pag. 755.

di punti più intensamente colorati, e poscia con un obbiettivo ad immersione, per esaminare i bacilli isolati ai margini dell'ammasso.

Oltre che nell'interno degli organi, i bacilli si trovano talvolta, nei casi più gravi, anche nel sangue. Così Neuhauss (1) ha potuto coltivarli alcune volte dal sangue estratto dalle macchie di roseola tifosa durante la vita. Col sangue i bacilli tifosi possono arrivare alla placenta materna, e da questa anche passare nel feto, come lo dimostrano i casi osservati da Eberth (2) e da Ernst (3). La presenza dei bacilli nel sangue è però tutt'altro che un fenomeno costante, e non può, come da taluni si è proposto, servire come criterio diagnostico della malattia.

Neppure l'esame del sangue estratto dalla milza può servire sicuramente per quello scopo, giacchè in quest'organo i bacilli sono distribuiti, come si è detto, non uniformemente, ma a gruppi sparsi in modo irregolare nell'interno dell'organo: cosicchè, se l'ago della siringa non si imbatte in qualche ammasso di bacilli, può l'esame microscopico e batteriologico del sangue estratto riuscir negativo, e tuttavia trattarsi di tifo.

I bacilli del tifo si trovano invece sempre nelle feci, almeno in certi periodi della malattia, e spesso anche nelle orine. Nelle feci, secondo le osservazioni di Karlinski (4), non si trovano prima del 9° giorno di malattia, e sono specialmente abbondanti nel 12°-14° giorno, e allorquando vi sono emorragie intestinali.

Nelle orine invece, secondo osservazioni dello stesso Karlinski (5), appaiono anche prima che nelle feci (3° giorno di malattia), e sono anche più facili a dimostrarsi che in queste, dove si trovano commisti a tanti altri batterî. Nelle orine Neumann (6) li ha dimostrati 11 volte su 48 casi osservati, e Karlinski 21 volte su 44.

L'esame batteriologico delle feci e delle orine può adunque servire per la diagnosi del tifo addominale, assai meglio che quello del sangue, sia estratto dal dito che dalla milza, per quanto neppur quello possa dirsi un mezzo di riuscita sicuro in tutti i casi.

(1) Neuhauss, *Nachweis der Typhusbacillus am Lebenden*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 6 e 24. 1886.

(2) Eberth, *Geht der Typhusorganismus auf den Fötus über?* Fortschr. d. Medicin., N.° 5, 1889.

(3) Ernst, *Intrauterine Typhusinfection einer lebensfähigen Frucht*, Ziegler's Beiträge, ecc. 1890, pag. 188.

(4) Karlinski, *Untersuchungen über das Verhalten der Typhusbacillen in typhösen Dejectionen*, Centralblatt f. Bacteriologie. Vol. 6.°, 1889. pag. 65.

(5) Karlinski, *Untersuchungen über das Vorkommen der Typhusbacillen im Harn*, Prager med. Wochenschr. N.° 35-36, 1890.

(6) Neumann, *Ueber Typhus-Bacillen im Urin*, Berliner klin. Woschenschr. N.° 6, 1890.

Il bacillo del tifo può conservarsi a lungo vivente nell'interno dell'organismo umano. Un bell'esempio di tal fatto si ha nel caso osservato da Orlow (1), il quale trovò il bacillo tifoso, capace di sviluppo, nel pus di una periostite tibiale, in una persona che aveva sofferto il tifo 8 mesi prima e che ne era guarito da sei mesi e mezzo.

Quanto alle complicazioni, che si osservano di frequente nel decorso del tifo addominale (polmonite, risipola, gangrena, ascessi, ecc.), alcune di esse sono dovute ad un'*infezione mista* da bacillo tifoso e da altri batterî patogeni, che penetrano per lo più nell'organismo in via secondaria, ed altre invece allo stesso bacillo del tifo.

La più importante fra le prime è l'infezione mista da streptococco e da bacillo del tifo, la quale può essere primitiva, oppure secondaria, associandosi in questo caso l'infezione da streptococco all'infezione tifica già in corso. La presenza dello streptococco aggrava di molto la malattia, come si è provato anche sperimentalmente negli animali, inoculando i due microrganismi uniti insieme (Vincent (2)).

Fra le complicazioni, o localizzazioni che dir si vogliano, dovute allo stesso bacillo tifoso, citiamo principalmente la polmonite (3), la meningite (4), e gli ascessi che si sviluppano spesso nel decorso del tifo, o nel periodo di convalescenza, nei quali l'osservazione microscopica e le culture hanno dimostrato molte volte soltanto la presenza del bacillo tifoso.

Coloro i quali ritengono (Baumgarten, Fränkel) che le complicazioni del tifo sieno sempre dovute ad altri microrganismi, sono costretti ad ammettere che questi sieno scomparsi prima del momento in cui si compì l'osservazione. Questa però è finora una semplice ipotesi, e non può avere maggior valore della prova sperimentale, prodotta da più di un osservatore (Orlow (5), Belfanti (6), Colzi (7)) sul potere piogeno che il bacillo del tifo, in cultura netta, esercita anche negli animali.

---

(1) Orlow, *Wie lange können die Typhusbacillen in menschlichen Korper ebensfähig bleiben?*, Deutsche med. Wochenschr. N° 48, 1890.

(2) Vincent, *Streptocoque et bacille typhique*, Annales de l'Institut Pasteur, 1893, pag. 141.

(3) Foà e Bordoni-Uffreduzzi, *La pneumonite dei tifosi*, Riforma medica, 1887.

(4) Mensi e Carbone, *Un caso di meningite cerebro-spinale da bacillo di Eberth*, Riforma medica, 1893, pag. 14.

(5) Orlow, *Zur Aetiologie der den Typhus abdominalis complicirenden Eiterungen*, Centralbl. f. Bacter. Vol. 8°, 1890, pag. 366.

(6) Belfanti, *L'infezione tifosa*, Rivista italiana generale di Clinica medica, 1890, pag. 486.

(7) Colzi, *Della suppurazione dovuta al bacillo del tifo*, Lo Sperimentale, 1890, pag. 623.

Riguardo alla maniera con cui la malattia si trasmette all'uomo, secondo Pettenkoffer e la sua scuola, il virus non si trasmetterebbe per contagio diretto, ma dovrebbe subire prima un passaggio nel terreno, dove acquisterebbe la forza infettante, e da dove poscia, per mezzo dell'aria, penetrerebbe nel nostro organismo per la via degli organi respiratorî.

Tutto questo però non si accorda punto colle nostre conoscenze batteriologiche sul bacillo del tifo; giacchè anzitutto non è ancora dimostrato che coll'aria fuoriescano dal terreno anche i microrganismi, e nel caso speciale poi il bacillo del tifo non si è mai trovato nell'aria, ma si è trovato invece nell'acqua potabile, in molti casi di epidemie localizzate, che si sono potute studiare esattamente, sia dal punto di vista clinico ed epidemiologico, come da quello batteriologico. Si è trovato inoltre che esso vegeta benissimo nel latte e in altre sostanze che servono per la nostra alimentazione (1), cosicchè possono queste servire facilmente come mezzo di diffusione del germe tifogeno. Finalmente le alterazioni anatomiche primitive e principali della malattia si trovano nel tubo gastroenterico, e non nell'albero respiratorio; è quindi più ragionevole ammettere che il primo, e non questo, rappresenti la porta d'ingresso del germe infettante.

Noi sappiamo del resto che i bacilli del tifo abbandonano in copia l'organismo ammalato per mezzo delle feci, dove secondo le ricerche di Uffelmann (2) possono non solo mantenersi viventi parecchi mesi, ma, se la temperatura è favorevole, possono anche moltiplicarsi.

Se a ciò si aggiunge il fatto, che tali microrganismi possono mantenersi viventi parecchi giorni nelle sostanze alimentari (ad es., fino a 35 giorni nel latte e 3 settimane nel burro (3)), e nell'acqua comune, si trova anche per ciò giustificato lo ammettere che i principali veicoli di trasmissione del germe tifoso sieno appunto le sostanze alimentari, e specialmente l'acqua da bere, contaminata dai germi emessi dagli infermi colle materie fecali, sia immediatamente e sia mediatamente per mezzo del suolo. Con ciò non resta escluso però che il contagio si possa trasmettere anche direttamente da un individuo all'altro per mezzo delle mani o della biancheria, sporche di materie fecali.

(1) Hesse, *Unsere Nahrungsmittel als Nährböden für Typhus und Cholera*, Zeitschr. f Hygiene, Vol. 5.°, 1890, pag. 527.

(2) Uffelmann, *Die Dauer der Lebensfähigkeit von Typhus-und Cholera-Bacillen in Fäcalmassen*, Centralblatt f. Bacter. Vol. 5.°, 1889, pag. 497.

(3) Heim, *Ueber das Verhalten der Krankheitserreger der Cholera, der Unterleibstyphus und der Tuberkulose in Milch, Butter, Molken und Käse*, Arbeiten a. d. Kais. Ges. Vol. 5.°, 1889, pag. 294.

Riguardo all'importanza che può aver l'acqua per la diffusione del tifo, se la questione non può dirsi ancora completamente risolta, si può dire però, con molta probabilità, di non essere lontani dal vero ammettendo, come sopra si è detto, che essa costituisce uno dei veicoli principali dell'infezione. E difatti, contro le osservazioni di Karlinski (1), secondo il quale i bacilli del tifo introdotti nelle acque di pozzo e di cisterna vi scompaiono rapidamente e non sono più dimostrabili dopo poco tempo (in 2 a 8 giorni al più), citiamo, fra le altre, quelle di Uffelmann (2), il quale ha trovato nell'acqua di un pozzo i bacilli viventi fino dopo 2 settimane, quelle di Wolffhügel e Riedel (3), che li hanno trovati viventi fin dopo 32 giorni, e quelle di Straus e Dubarry (4), secondo i quali nell'acqua sterilizzata i bacilli del tifo possono mantenersi viventi anche fino a 81 giorni.

Le acque possono venire contaminate, o direttamente per filtrazione delle materie fecali dalle latrine, attraverso le pareti dei pozzi, oppure indirettamente per mezzo del suolo, dove la presenza dei germi tifogeni è stata dimostrata anche sperimentalmente da Salomonsen e da Macé (5).

Per la profilassi del tifo si dovrà quindi mirare anzitutto a distruggere il germe nelle materie fecali degli infermi, il che si può fare agevolmente, stante la poca resistenza di esso, anche coll'aggiunta di disinfettanti non molto energici e poco costosi, come sarebbe il latte di calce: si baderà inoltre a mantenere l'acqua da bere in condizioni tali, che sia escluso ogni inquinamento per parte delle materie fecali, o per parte del suolo inquinato da esse, e si cercherà in pari tempo di migliorare nelle città le condizioni igieniche del terreno.

10. Bacillo di Lustgarten.

Chiamiamo così un bacillo, che Lustgarten (6) ha per primo dimostrato nell'interno delle neoformazioni sifilitiche e nel secreto delle ulceri, per mezzo di un metodo di colorazione speciale, che fu a suo luogo descritto, e che è simile d'aspetto a quello della tubercolosi, per lo più ricurvo e colle estremità rigonfie, e si trova sempre rinchiuso entro cellule grosse.

Malgrado le osservazioni numerose fatte in proposito, il valore specifico del bacillo di Lustgarten per la sifilide è finora molto problematico, sia perchè non si è riusciti ancora a coltivarlo, e sia specialmente perchè nelle neoformazioni sifilitiche si trova così scarso, che è necessario preparare sovente un gran numero di sezioni, prima di avere la fortuna di incontrare qualche gruppo di bacilli; cosicchè nè il loro numero, nè la loro disposizione nei tessuti ammalati servono

(1) Karlinski, *Ueber das Verhalten des Typhusbacillus im Brunnenwasser*, Archiv f Hygiene Vol. 9 (1889), pag. 113 e 432, Vol. X (1890), pag. 461.

(2) Uffelmann, *Trinkwasser und Infectionskrankheiten*, Wiener med. Presse, N. 37, 1888.

(3) Wolffhügel u. Riedel, *Die Vermehrung der Bacterien im Wasser*, Arbeiten a. d. Kais. Gesundheitsamte, 1886, pag 455.

(4) Straus et Dubarry, *Recherches sur la durée de la vie des microbes pathogènes dans l'eau*, Arch d. mél. expér. et d'anat. path. T. 1, p 5, 1889.

(5) Macé, *Sur la présence du bacille typhique dans le sol*, Comptes rendus Acad d sc. 1888.

(6) Lustgarten, *Die Syphilisbacillen*, Wiener med. Iahrbücher, 1885, pag. 89.

a rendere ragione in maniera sufficiente del prodursi dei fenomeni patologici.

Notiamo inoltre che neppure il metodo di colorazione di Lustgarten si può dire speciale di tali bacilli, giacchè si è trovato che si colorano egualmente collo stesso metodo anche altre forme bacillari, che si trovano comunemente nello smegma del prepuzio, fra le grandi e le piccole labbra, e attorno all'ano nelle persone normali, come hanno osservato contemporaneamente Alvarez e Tavel (1), e Matterstock (2): oltre a ciò, come si è detto a proposito dei bacilli tubercolari (pag. 329), il metodo di Lustgarten serve bene a colorare anche questi ultimi microrganismi, e non è quindi improbabile che nelle osservazioni primitive di Lustgarten e degli altri che le hanno confermate sia avvenuto uno scambio coi bacilli della tubercolosi. Per tutte queste ragioni adunque, per quanto alcune autorità scientifiche sostengano tuttora il valore specifico del bacillo di Lustgarten, come fa Doutrelepont, il quale afferma di aver trovato un metodo di colorazione che serve a differenziare i bacilli che si trovano nelle neoformazioni sifilitiche da quelli dello smegma, pur tuttavia, secondo i dati di fatto che finora si conoscono, dobbiamo esprimerci su ciò con molto riserbo.

11. Bacillo dell'influenza.

È stato Pfeiffer (3) il primo che ha dato la notizia di aver trovato costantemente nell'essudato bronchiale dei malati d'influenza un bacillo speciale, che si distingue per certi caratteri da tutti gli altri finora conosciuti.

Quasi contemporaneamente Canon (4) e Kitasato (5) in Germania, e un po' più tardi Bruschettini (6) in Italia, affermarono di avere osservato e coltivato dal sangue dei malati d'influenza lo stesso bacillo scoperto da Pfeiffer negli sputi.

Stando a quanto afferma lo scopritore di questo microrgani-

(1) Alvarez et Tavel, *Rècherches sur le bacille de Lustgarten*, Archives de phys. norm. et path., 1885, pag. 303.

(2) Matterstock, *Ueber Bacillen bei Syphilis*, Verhandlungen d. Würzb. phys. med. Gesellschaft, Iuin 1885.

(3) Pfeiffer, *Vorläufige Mittheilungen über den Erreger der Influenza*, Deutsche med. Wochenschr., N.° 2, 1892.

(4) Canon, *Ueber einen Mikroorganismus im Blute von Influenzakranken*, Ibid. N.° 2, 1892.

Id. *Ueber Züchtung des Influenzabacillus aus dem Blute der Influenzakranken*, Ibid. N.° 3, 1892.

(5) Kitasato, *Ueber den Influenzabacillus und sein Kulturverfahren*, Ibid. N.° 2. 1892.

(6) Bruschettini, *Ricerche batteriologiche sull' influenza*, Riforma medica, N.° 23 e 66, 1892.

smo in una posteriore sua pubblicazione (1), nessuno degli osseri vatori soprannominati avrebbe avuto fra mano il vero bacillo dell' influenza, adducendo egli a sostegno della sua opinione il duplice fatto, che a lui non è mai riuscito di coltivarlo dal sangue dellpersone affette d'influenza, e che i bacilli coltivati dagli altri non rispondono alla caratteristica principale da lui scoperta pel suo bacillo, che è quella di svilupparsi nei mezzi di nutrizione ordinarî (agar glicerinata o zuccherata a 1 $^1/_2$ $^0/_0$, siero di sangue umano, o d'animali) soltanto nella prima generazione, mentre per ottenerne lo sviluppo nei successivi trapianti, bisogna adoperare un mezzo speciale, preparato *distendendo una goccia di sangue umano, raccolto sterile, sulla superficie dell'agar* disposta nei tubi obliquamente. Il sangue di coniglio può sostituire quello umano, ma con minor successo; il siero di sangue umano invece non serve, secondo Pfeiffer, in luogo del sangue, per la coltivazione del bacillo.

Il bacillo dell'influenza durante la malattia viene emesso nel mondo esterno per mezzo dello sputo, e per farne la ricerca in questo materiale bisogna anzitutto prendere lo sputo fresco del mattino, raccolto in sputacchiere ben pulite, e scegliere da esso le parti più dense, di colore giallo-verdastro, che rappresentano veramente il secreto bronchiale. Una piccola parte di questo si distende accuratamente sul vetrino coproggetti, si lascia disseccare3 si fissa riscaldandolo moderatamente, e si colora per 10 minuti nella soluzione Ziehl di fucsina, diluita per 10-20 volte coll'acqua distillata. Se si tratta di farne la ricerca nel tessuto polmonare, si tengono le sezioni per 30 minuti nella stessa soluzione, e si immergono poscia nell'alcool assoluto, acidificato leggermente con acido acetico, badando a che la decolorazione non si faccia eccessiva.

Nello sputo, preparato come si è detto, i bacilli nei casi recenti e senza complicazioni si trovano in grandissima quantità, in parte liberi e in gran parte racchiusi nel protoplasma delle cellule purulente, tutto attorno al nucleo (Tav. VI fig. 11); spesso si vedono anche riuniti in catenelle di 3-4 individui cellulari.

Questi bacilli si è detto da taluni che assomigliano molto pel loro aspetto a quelli della setticemia dei topi; in realtà però sono notevolmente più corti ed anche più sottili di essi, tanto che, ossere vati con un ingrandimento insufficiente, possono avere l'apparenza di diplococchi, essendo più intensamente colorati alle estremità che nel mezzo: sono però privi di capsula, ed il metodo Gram non li colora.

(1) Pfeiffer u. Beck, *Weitere Mittheilungen über den Erreger der Influenza*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 21, 1892.

Per coltivarli dal secreto bronchiale, Pfeiffer consiglia di prendere una piccola quantità di secreto, nel quale si è dimostrata coll'esame microscopico la presenza dei bacilli, di stemperarlo in 1 cc. di brodo sterile, di distribuire un'ansa di platino di quest'emulsione sulla superficie di un tubo di agar con sangue, e di prendere dalla superficie di questo un po' di materiale coll'ansa di platino, distribuendolo in un 2.° tubo.

Dopo 20 ore di permanenza a 37° C., compaiono sull'agar le colonie del bacillo, sotto forma di goccioline, chiare come l'acqua, visibili soltanto coll'aiuto d'una lente, le quali confluiscono solamente allorquando sono molto vicine fra di loro.

Secondo Pfeiffer, il reperto anatomo-patologico del polmone, nei casi tipici di influenza, senza complicazioni, è assai caratteristico. Non si trova una vera epatizzazione, ma soltanto focolaj di bronco-polmonite, più o meno numerosi, e situati per lo più nel lobo inferiore del polmone: dal lume dei bronchi recisi, che si trovano nel centro dei focolaj, fuoriesce un liquido denso, muco-purulento, giallo-verdastro, nel quale si trovano i bacilli dell'influenza in grandissima quantità e in cultura pura.

Le sezioni del polmone, colorate ed osservate al microscopio, dimostrano il lume dei bronchi ripieno di cellule purulente e di bacilli; nei focolaj di bronco-polmonite si trovano, nel centro, alveoli e setti, tutti ripieni di cellule purulente, contenenti i bacilli, e alla periferia un'infiammazione catarrale desquamativa. Di fibrina col metodo di colorazione Weigert si trova appena una traccia.

Mentre adunque, secondo Pfeiffer, il processo morboso dell'influenza sarebbe semplicemente locale e limitato al polmone, secondo Bruschettini (1) invece, ed anche secondo Canon, il quale ha confermato con maggiori particolari il primitivo reperto del bacillo nel sangue degli infermi (2), si tratterebbe di un processo non soltanto locale, ma spesso anche generale e setticoemico.

Le osservazioni di Bruschettini meritano invero una speciale considerazione, sia perchè egli su 13 casi di influenza che ha studiato ha ottenuto in 11 la cultura pura di uno stesso bacillo, molto simile a quello di Pfeiffer, nel sangue degli infermi, e sia perchè ne ha potuto anche dimostrare le proprietà patogeniche, riproducendo nel coniglio fenomeni morbosi simili a quelli dell'uomo, mentre i precedenti osservatori non si erano potuti pronunciare con certezza sul potere patogenico del bacillo da essi coltivato.

La causa della divergenza nei risultati ottenuti da Bruschettini, in confronto con quelli di Pfeiffer, devesi probabilmente

(1) Bruschettini, *Ricerche batteriologiche sull'influenza*, Archivio per le Scienze mediche, Fasc. 4.°, 1892. — Id. *Nuovo contributo allo studio del bacillo dell'influenza*, Riforma medica, N.° 81, 82, 83, Aprile 1893.

(2) Canon, *Die Influenza-Bacillen in lebenden Blute*, Wirchow's Archiv Bd. 131, Heft 3, 1893.

ricercare nel metodo diverso impiegato nelle ricerche, giacchè Bruschettini, per coltivare i bacilli dal sangue, estraeva asetticamente dalle vene del braccio, mediante la siringa Tursini, 8-10 cc. di sangue, facendo riprodurre i microrganismi nel sangue stesso, tenuto nel termostato a 37° C., e col prodotto di queste culture inoculava i conigli, i quali, se l'iniezione era fatta nella trachea o nel peritoneo, morivano sicuramente per infezione prodotta dal bacillo inoculato.

Secondo la descrizione fatta da Bruschettini dei caratteri biologici del microrganismo da lui coltivato, il bacillo dell'influenza, di aspetto simile affatto a quello di Pfeiffer, come si può vedere nella fig. 10 della Tavola VI, cresce bene anche nell'agar glicerinata, disposta a becco di clarinetto (a 37° C.), se trapiantato direttamente dalle culture nel sangue, e la cultura si presenta sotto forma di piccole colonie trasparenti, rotonde, grigiastre, simili a goccioline di rugiada, oppure, se il materiale era molto ricco di bacilli, sotto forma di sottilissimo velo grigiastro, finamente punteggiato, trasparente, a superficie umida e lucente.

Nel siero di sangue gelatinizzato l'aspetto delle culture è simile a quello ora descritto, e la cultura è assai rigogliosa.

Nel sangue del coniglio, raccolto sterile, il bacillo si sviluppa molto rigogliosamente, come nel sangue dell'uomo, tanto in presenza dell'aria, come nel vuoto (Bruschettini). Il sangue è il mezzo di nutrizione che più si mostra adatto per lo sviluppo e per la conservazione del microrganismo.

Anche nel brodo a 37° C. lo sviluppo del microrganismo è abbondante, sotto forma di fiocchi biancastri che si depositano al fondo e sulle pareti del recipiente, lasciando il brodo trasparente. Il brodo conserva inalterata la sua reazione alcalina.

Nella gelatina, a 22° C., trapiantandolo dal sangue, si sviluppa stentatamente, formando un nastrino sottile, grigiastro, finamente punteggiato, simile alla cultura dello streptococco piogeno.

Tanto nel brodo però, come nell'agar e nella gelatina, lo stesso Bruschettini è venuto (1) ad ammettere che lo sviluppo del microrganismo si ottiene soltanto, allorquando l'innesto in tali mezzi si fa direttamente da culture sviluppate nel sangue; il che vuol dire che ha ragione Pfeiffer, il quale afferma che lo sviluppo del bacillo negli ordinarî mezzi di nutrizione si ottiene soltanto a patto che essi contengano traccie di sangue.

Il bacillo dell'influenza, secondo Pfeiffer, è strettamente aerobio, e secondo Bruschettini invece è anaerobio facoltativo.

(1) Bruschettini, *Alcune questioni intorno al bacillo dell'influenza*, Riforma medica 1893, N. 186.

Non è dotato di mobilità, e comunque coltivato non forma spore.

Quanto alla sua colorazione, come si è già detto per la ricerca del microrganismo negli sputi, i migliori preparati si ottengono colla fucsina Ziehl e colla soluzione Löffler di azzurro di metilene a caldo. Pei preparati di sangue Canon raccomanda la miscela proposta da Plehn pei parassiti malarici, composta da:

Soluzione acquosa conc. di azzurro di metilene . .	40
Soluzione di eosina $^1/_2$ % nell'alcool a 70 % . . .	20
Acqua distillata	40

I preparati, fissati nell'alcool assoluto per 10 minuti, si tengono nella soluzione colorante a 37° C. (nel termostato) per 3-6 ore, si lavano con acqua e si chiudono nel balsamo.

Il metodo Gram, come si è detto, non lo colora.

Quanto alla sua resistenza agli agenti fisici e chimici, secondo Bombicci (1), questo microrganismo resta ucciso da una temperatura di 60° C. in 5-10 minuti, e nella corrente di vapor d'acqua in 1 minuto; si mostra invece molto resistente all'azione del disseccamento, resistendo al disseccamento rapido per 26 giorni e a quello lento per 70 giorni circa.

Un' altra prova di questa sua resistenza all' essiccamento si avrebbe pure nel fatto, osservato da Bruschettini, di un'epidemia di laboratorio da bacillo dell' influenza, sviluppatasi spontaneamente nei conigli tenuti in gabbie, nelle quali si erano tenuti, qualche mese addietro, conigli inoculati collo stesso microrganismo.

Questo microrganismo sarebbe anche molto resistente all'azione della luce solare, giacchè le culture di esso, distese sui vetrini ed esposte al sole, si trovarono morte soltanto dopo 96-144 ore di insolazione. Sarebbe invece poco resistente all'azione degli agenti chimici, venendo rapidamente ucciso dal sublimato 1 ‰, dall'acido fenico 2 % e dal nitrato d'argento 1 %.

Quanto all'azione patogena, il bacillo coltivato da Bruschettini è fortemente virulento pel coniglio e per la cavia, e non lo è invece pel piccolo topo bianco e pel cane. La sua azione patogena è inoltre essenzialmente diversa, secondo la natura del mezzo in cui si è fatto sviluppare, giacchè mentre le culture fatte nel brodo e nell'agar sono poco attive, quelle invece fatte nel sangue sono dotate di un altissimo potere patogeno, tossico ed infettante.

Oltre a ciò, la sua azione si esplica pure diversamente, a seconda della diversa via per la quale si introduce.

(1) Bombicci, *Sulla resistenza del bacillo dell'influenza agli agenti fisici e chimici*, Riforma medica, N.° 110-111, 1892.

Il reperto sperimentale più interessante si ha iniettando culture molto attive nella trachea del coniglio: questa iniezione è seguita da un'elevazione forte della temperatura, e dalla morte dell'animale, in un intervallo di tempo variabile secondo la quantità del materiale iniettato. Se si inietta una quantità notevole di materiale ($^1/_2$ cc. di cultura sviluppata nel sangue), la morte dell'animale si ha in 48 ore circa coi fenomeni di una violenta congestione bronco-polmonare; ma se si iniettano invece 2 goccie di cultura, la morte avviene dopo 8-10 giorni col quadro clinico dell'influenza, e colle lesioni bronco-polmonari proprie di questa malattia. Nei polmoni si trovano infatti focolaj tipici di bronco-polmonite, accompagnati da infiammazione siero-fibrinosa della pleura e del pericardio. Nel muco bronchiale, come nel sangue degli animali morti, si trova abbondantemente riprodotto il bacillo inoculato (1).

Le prime culture ottenute dal sangue dell'uomo, iniettate nella trachea del coniglio, aumentano di virulenza nei successivi passaggi attraverso l'organismo di quest'animale.

L'iniezione nel peritoneo del bacillo coltivato nel sangue determina anch'essa la morte in un tempo variabile, secondo la dose: iniettando 2 cc. di cultura, si ha la morte in meno di 24 ore per intossicazione acuta, e iniettandone invece poche goccie, l'animale muore dopo 8-10 giorni coi fenomeni di peritonite, e talora anche di pleurite.

L'intossicazione o l'infezione avvengono pure in seguito all'iniezione della cultura nel circolo sanguigno, producendosi la morte in modo rapido, o lento, a seconda della quantità del materiale che viene iniettato.

Secondo Bruschettini, basta anche deporre sulla mucosa nasale intatta del coniglio poche goccie di cultura, per produrre l'infezione e la morte dell'animale, dopo 20-25 giorni, con fenomeni di abbondante scolo nasale e di tracheo-bronchite, accompagnati da focolaj embolici nel polmone e nel rene.

Un quadro morboso, simile a quello che si ha dall'iniezione in trachea, si ottiene pure mediante l'inalazione di materiale polverulento, impregnato di bacilli (Bombicci (2)).

L'iniezione sottocutanea invece, se fatta con materiale molto virulento, dà luogo a produzione di pus locale, molto abbondante, producendo però solo talvolta, e non sempre, la morte dell'animale

(1) I fatti relativi all'azione patogenica del microrganismo, qui riferiti, sono stati controllati anche dallo scrivente, mediante una cultura inviata dallo stesso Bruschettini. — L'*Autore*.

(2) Bombicci, *Sulla diffusione dell'influenza per mezzo dell'aria*, Riforma medica, N.° 188, 1892.

per marasma, dopo molti giorni. L'azione piogena del microrganismo si manifesta pure in seguito all'iniezione nella camera oculare anteriore.

È notevole il fatto dell'innalzamento della temperatura, che si verifica costantemente negli animali, qualunque sia la via d'introduzione del microrganismo, e che si verifica egualmente in seguito all'iniezione dei prodotti sterili delle culture.

Bruschettini (1) ha completato lo studio del suo microrganismo, ricercando anche le condizioni di immunizzazione e di guarigione degli animali infetti, ed ha potuto constatare che gli animali si rendono facilmente immuni mediante l'iniezione delle culture fatte nel sangue, filtrate, che il siero sanguigno degli animali resi immuni non ha proprietà battericide, ma sibbene antitossiche verso il bacillo virulento, che questo siero ha la proprietà di conferire agli animali l'immunità, e contro l'infezione e contro l'intossicazione prodotta dal bacillo, e che finalmente lo stesso siero possiede una spiccata azione curativa, abbassando la temperatura febbrile e salvando dalla morte conigli, nei quali si è fatta 48 ore prima l'iniezione in trachea di una dose mortale.

Se ora ci facciamo a considerare le differenze esistenti fra i risultati ottenuti da Bruschettini e quelli di Pfeiffer, si trova che sono abbastanza notevoli, non tanto per ciò che riguarda le proprietà morfologiche e di sviluppo dei due microrganismi, quanto piuttosto riguardo alla loro azione patogena, avendo Pfeiffer constatato pel suo bacillo una certa azione patogena sulla scimmia (febbre) e nessun'azione sul coniglio. Aspettiamo adunque che ulteriori osservazioni vengano a confermare l'opinione, già espressa, che la causa di tale divergenza risieda realmente nella maniera dell'esperimento e nel diverso grado di virulenza del microrganismo, prima di conchiudere con certezza che il bacillo, osservato e coltivato da Pfeiffer dagli sputi, sia lo stesso di quello coltivato dal sangue, e sia quindi esso il vero ed unico agente specifico dell'influenza.

12. Bacillo piocianeo e del pus verde.

Questo microrganismo è importante, non solo dal lato sperimentale, perchè la sua biologia è stata oggetto di studì molto accurati, ma lo è anche per la patologia umana, giacchè si è trovato che può essere infettante anche per l'uomo.

(1) Bruschettini, L'*immunità sperimentale nell'influenza*, Riforma medica, 1893, N.º 163.

È detto « piocianeo e del pus verde », perchè è la causa della colorazione azzurra, o verde, che assumono talora spontaneamente il pus delle piaghe e gli oggetti di medicazione (1), e si trova non di rado sulla pelle normale, nel sudore e negli sputi (2). È un bacillo corto, come quello della setticemia dei topi, ma più spesso; è dotato di movimenti proprî vivaci, dovuti alla presenza di un filamento ciliare, unipolare. Non è sporigeno: è anaerobio facoltativo, e si sviluppa bene alla temperatura ordinaria, ma meglio a quella di 37° C.

Nella gelatina cresce fluidificandola rapidamente e producendo in essa una colorazione verde fluorescente; sulla superficie dell'agar forma uno strato umido, giallastro, con riflessi madreperlacei, mentre l'agar assume gradatamente un bel colore verde fluorescente, e sulla patata la colonia di questo bacillo ha un colore giallo-verdastro, che si fa in seguito sempre più scuro, colorando anche all'intorno la sostanza della patata. Nel brodo cresce attivamente, colorandolo in verde e poscia in giallo-bruno. Cresce bene nel latte, precipitando prima la caseina e poscia ridisciogliendola con produzione d'ammoniaca. In qualunque mezzo sia fatta la cultura, essa emette sempre un odore disgustoso, fecaloide.

È interessante il fatto, constatato da Charrin (3), delle variazioni notevoli che si possono produrre nella forma di questo microrganismo, aggiungendo al liquido di cultura (brodo) una certa quantità di acidi o di altri disinfettanti, in quantità non sufficienti per produrre la morte dei batterî. Si producono in tal modo forme svariate di cocchi, di bastoncini corti e lunghi, e di filamenti diritti e ondulati, a mo' di spirillo.

Per ciò che riguarda la funzione cromogena del microrganismo, esso è atto a produrre due diverse sostanze coloranti: una azzurra, la piocianina, e l'altra verde fluorescente. La produzione di queste due sostanze è in dipendenza di due fattori principali, e cioè della composizione del mezzo nutritivo e della diversa razza batterica. Questo microrganismo offre uno dei più belli esempî dell'influenza che può avere la composizione del mezzo in cui si sviluppa sulla produzione della sostanza colorante. Secondo le osservazioni di Gessard (4), havvi una varietà di bacillo, così detto *normale*, capace di produrre ambedue i pigmenti, azzurro e verde, il quale però col-

(1) Gessard, *De la pyocyanine et de son microbe*, Thèse de Paris, 1882.

(2) Frick, *Bakteriologische Mittheilungen über das grüne Sputum*, ecc. Virchow's Archiv, Vol 116, pag. 266.

(3) Charrin, *La maladie pyocyanique*, Paris, 1889.

(4) Gessard, *Nouvelles recherches sur le microbe pyocyanique*, Annales de l'Institut Pasteur, 1890, pag. 88. — Id., *Des races du bacille pyocyanique*, Ibid. 1891, pag. 65.

tivato nella soluzione neutra, o debolmente alcalina, di peptone al 2 % non produce che la piocianina, mentre invece coltivato nell'albumina d'uovo, pura o con aggiunta di glicerina, produce soltanto il pigmento verde. Nel brodo invece produce l'uno e l'altro pigmento. Con questo bacillo normale si possono produrre artificialmente due varietà di bacilli, che si riscontrano anche in natura, l'una delle quali produce solamente la piocianina, e l'altra il pigmento verde soltanto. Si può finalmente togliere addirittura al microrganismo qualsiasi proprietà cromogena, o aggiungendo ai mezzi di cultura piccole quantità di antisettici, come ha fatto Wasserzug (1), o facendo agire per 5 minuti la temperatura di 57° C. sulla varietà cianogena del bacillo.

Il bacillo piocianeo è patogeno, specialmente per la cavia e pel coniglio. È in questo animale che Charrin ha studiato l'azione del bacillo, sottoponendo quest'infezione, così detta da lui « malattia piocianica » ad uno studio accurato e completo sotto molti rapporti.

L'innesto sottocutaneo della cultura in brodo nel coniglio e nella cavia produce una suppurazione locale, l'infezione generale e la morte, in un tempo diverso secondo la quantità di materiale inoculato; l'iniezione nel peritoneo dà luogo ad una peritonite purulenta, e l'iniezione intravenosa produce la morte degli animali in breve tempo. In tutti i casi si ha una moltiplicazione abbondantissima dei bacilli inoculati nel sangue e in tutti gli organi dell'animale.

Se la quantità di cultura iniettata sottocute è insufficiente a produrre la morte, come anche se si iniettano negli animali le culture sterilizzate, questi acquistano l'immunità per l'infezione piocianica. L'iniezione della cultura di bacillo piocianeo può anche arrestare negli animali il decorso dell'infezione carbonchiosa (Bouchard (2)).

Ricordiamo infine che anche nell'uomo si sono osservati casi di infezione generale, prodotta da questo microrganismo (3), analoga a quella che si produce sperimentalmente nel coniglio.

(1) Wasserzug, *Sur la formation de la matière colorante chez le bacillus pyocyaneus,* Annales de l'Institut Pasteur, 1887, pag. 581.

(2) C. R. *Acad. des sciences*, 8 avril, 1888.

(3) Oettinger, *Un cas de maladies pyocyanique chez l'homme*, Semaine med. N.° 46, 1890 — Charrin, *Maladie pyocyanique chez l'homme,* Soc. de biologie, 26 juillet 1890.

13. Bacillo della setticemia dei topi e del mal rosso dei suini.

Col nome di bacillo della setticemia dei topi, Koch (1) ha designato un bacillo corto e sottile, da lui scoperto inoculando sottocute il sangue o l'infuso di carne, putrefatti, nel topo bianco e in quello casalingo, i quali muoiono così di una forma setticoemica, cagionata dal bacillo ora nominato.

Questo bacillo si colora bene col metodo di Gram, è anaerobio facoltativo e cresce nella gelatina in una maniera affatto caratteristica, formando tutto attorno al canale d'innesto (fatto per infissione) una specie di nubecola opaca, formata da filamenti sottili, grigiastri, che si irradiano dal canale d'innesto nell'interno della gelatina, come le barbe di una piuma (Tav. IV, fig. 6). La gelatina viene liquefatta, o meglio rammollita, assai lentamente.

Sull'agar cresce sotto forma di goccioline semitrasparenti. Nelle patate non si sviluppa.

Inoculato nei topi bianchi li fa morire in 2-3 giorni con una forma di setticemia, con milza grossa e con abbondante moltiplicazione dei bacilli nel sangue. Nelle sezioni degli organi interni di questi animali i bacilli si trovano abbondanti, specialmente nella milza e nel polmone, contenuti in parte nei vasi sanguigni e in parte nel tessuto (Tav. VI, fig. 12). Questo bacillo è patogeno pel topo bianco e per quello di casa, pel coniglio e pel colombo; non lo è invece pel topo campagnolo, per la cavia e per il pollo.

Inoculato nel coniglio sottocute alla base dell'orecchio, vi produce un'infiammazione erisipelatosa, che in generale guarisce e conferisce al coniglio l'immunità per l'infezione.

Quasi gli stessi caratteri di forma e di sviluppo, ora descritti, offre il bacillo che Löffler (2) e Schütz (3) hanno dimostrato essere l'agente patogeno di una malattia contagiosa dei suini, specialmente diffusa nelle razze inglesi, più fini, e che si distingue col nome di « mal rosso ». Questa malattia, da non confondersi con un'altra infezione che colpisce pure i suini, e che è detta « colèra dei suini » o « peste suina » o « pneumo-enterite infettiva », si distingue clinicamente per la presenza di chiazze rosse irregolari, che si manifestano sulla pelle, specialmente sulle orecchie, sul petto, sul ventre e sulla parte interna delle coscie, e per la rapidità con cui avviene la morte (24-48 ore). All'autopsia si trova la milza voluminosa, il fegato e gli organi linfatici congesti, e contenenti in gran numero bacilli simili per forma e per dimensioni (forse un po' più grossi) a quelli della setticemia de' topi. I bacilli sono specialmente abbondanti nel succo della milza, del fegato e del midollo delle ossa, e meno abbondanti nel sangue del cuore.

È inutile ripetere la descrizione del modo di svilupparsi nei mezzi solidi di cultura e delle proprietà patogeniche di questo bacillo, essendo perfettamente uguale a quella già fatta pel bacillo della setticemia dei topi. L'innesto delle culture di questo bacillo riproduce nei suini l'infezione naturale caratteristica. Il germe infettivo si propaga probabilmente per mezzo dell'ingestione di cibo inquinato colle feci di altri suini ammalati.

(1) Koch, *Untersuchungen über die Aetiologie der Wundinfectionskrankheiten*, Leipzig 1878.

(2) Löffler, *Experimentelle Untersuchungen über Schweine-Rothlauf*, Arbeiten a. d. Kais. Ges. Vol I. 1885, pag. 46.

(3) Schütz, *Ueber den Rothlauf der Schweine und die Impfung mit demselben*, Ibid. pag. 56.

Le culture attenuate servono come vaccino, per preservare gli animali dall'infezione (Pasteur). Le iniezioni preventive si praticano con un processo analogo a quello che si adopera per la vaccinazione carbonchiosa. Questo bacillo è patogeno per le stesse specie animali, per cui lo è quello della setticemia dei topi, e pare non lo sia per l'uomo.

14. Bacillo del colèra dei polli, o della setticemia emorragica (Hüppe).

Il bacillo del « colèra dei polli », malattia dei gallinacei, la quale decorre con sintomi analoghi a quelli del colèra umano, è stato osservato nel sangue e negli organi degli animali infetti, anzitutto da Perroncito (1), e poscia da Pasteur, il quale coltivò il microrganismo e riprodusse anche coll'innesto della cultura nei polli l'infezione caratteristica.

Questo stesso bacillo, o almeno bacilli molto affini ad esso nelle proprietà biologiche, e che si possono per ciò considerare come varietà di una stessa specie, sono stati riconosciuti causa di una serie di infezioni, tutte simili per decorso, proprie degli animali e non trasmissibili all'uomo, che Hueppe (2) ha raccolto sotto la denominazione unica di « setticemia emorragica ».

Il colèra dei polli è una malattia che si distingue anzitutto per la rapidità con cui si propaga, e per i sintomi speciali con cui si manifesta. Il pollo che ne è colpito barcolla come ebbro, tiene le ali penzoloni, se ne sta immobile, colle piume diritte, in preda ad una sonnolenza invincibile, ed ha diarrea. La morte avviene per lo più in 24-40 ore, e talvolta anche, nei casi fulminanti, in poche ore. All'autopsia si trova la milza grossa, il fegato voluminoso e giallastro, e l'intestino tenue infiammato e ripieno di liquido sieroso.

Nel sangue, nel succo degli organi e nel contenuto intestinale si trovano abbondanti i bacilli specifici, i quali sono corti e grossi, colle estremità arrotondate, spesso riuniti a due, ed immobili; quando si colorano, assumono l'aspetto di diplococchi, restando colorate intensamente le estremità e incolora la parte mediana del bastoncino (Tav. VII, fig. 4).

Non si colorano col metodo di Gram, non producono spore, sono anaerobi facoltativi, e crescono bene tanto alla temperatura dell'ambiente, come a 37° C; sulla patata però si sviluppano soltanto a 37° C. Crescono nella gelatina sotto forma di colonie grigiastre, isolate, rotonde, lungo il canale d'innesto, senza fluidificarla: sull'agar e sul siero formano uno strato biancastro splendente, che ha nulla di caratteristico.

Gli animali pei quali il microrganismo si mostra patogeno sono: il pollo, l'oca, il colombo, il topo e il coniglio. La cavia è quasi refrattaria. L'infezione si può trasmettere, o per mezzo del sangue degli animali infetti, o per mezzo delle culture recenti, e si produce sia per mezzo dell'innesto cutaneo o sottocutaneo, come anche introducendo il virus, mescolato cogli alimenti, nel tubo digerente (Pasteur).

Le culture del bacillo, invecchiando in presenza dell'ossigeno atmosferico, si attenuano, ed inoculate nei polli producono in questi una malattia locale, che conferisce loro l'immunità.

L'infezione naturale avviene, con tutta probabilità, per mezzo del cibo, inquinato colla diarrea degli animali infetti.

(1) Perroncito, *Ueber das epizootische Typhoïde der Hühner*, Archiv f. wiss. u. prakt. Thierheilkunde, 1879, pag. 22.

(2) Hueppe, *Ueber die Wildseuche und ihre Bedeutung für Nationalökonomie und Hygiene*, Berl. klin. Wochenschr. N.° 44-46, 1886.

Le altre malattie, raggruppate da Hueppe sotto il nome di « setticemia emorragica » e causate da microrganismi simili a quello ora descritto, sono: la *setticemia dei conigli*, che è una malattia prodotta sperimentalmente da Gaffky (1) in questi animali mediante l'innesto sottocutaneo delle acque immonde di un confluente (Panke) della Sprea a Berlino, la così detta *peste suina* (*Schweineseuche* dei tedeschi), la quale secondo alcuni (2) sarebbe eziologicamente diversa dalla malattia studiata in America col nome di *colèra dei suini* (Hog-cholera, Swine-plague), il *barbone buffalino* (Oreste e Armanni) e la *peste degli animali selvatici* (*Wildseuche* di Hueppe, *Frettenseuche* di Eberth e Schimmelbusch).

Secondo Frankel (3) però le malattie sopra citate dovrebbero dividersi in 2 gruppi: uno di questi, comprendente la peste suina, quella degli animali selvatici di Hueppe, il barbone buffalino e la setticemia dei conigli, riconoscerebbe per causa un microrganismo privo di mobilità, simile affatto a quello del colèra dei polli; l'altro gruppo invece, comprendente il colèra dei suini, americano e danese, e la peste del furetto di Eberth, sarebbe prodotto da un microrganismo che si distingue dal primo, perchè mobile e provvisto di organi ciliari. I microrganismi di quest'ultimo gruppo sarebbero, secondo le osservazioni di Caneva (4), affini al gruppo del *B. coli*.

15. Pneumobacillo di Friedländer. Bacillo del rinoscleroma.

Il bacillo pneumonico di Friedländer, da questi descritto originariamente col nome di « pneumococco », è il primo microrganismo che venne isolato dal polmone epatizzato, e fu perciò creduto dal suo scopritore l'agente specifico della polmonite crupale Ora invece questo microrganismo non ha più che un'importanza molto secondaria, giacchè le osservazioni successive hanno dimostrato che il vero agente specifico di quella malattia è il « diplococco di Fränkel », così detto dal nome di chi ne ha per primo stabilito l'importanza specifica.

Il bacillo di Friedländer, oltrechè si trova assai di rado, invece che costantemente, nel polmone infiammato, si trova anche spesso nella saliva e nel secreto nasale di persone sane, nonchè nell'escreato polmonare in altre malattie.

E un bacillo sprovvisto di movimenti proprî, non sporigeno, di lunghezza variabile, in generale però corto e grosso (Tav. VII, fig. 5), e munito di capsula, soltanto allorquando si sviluppa nell'organismo

(1) Gaffhy. *Ueber experimentell erzeugte Septicämie*, Mitt. a. d. Kais. Gesundheitsamte. Vol. I, 1881, pag. 102.

(2) Raccuglia, *Ueber die Bacterien der amerikanischen Swine-Plague (Hog-Cholera) und der deutschen Schweine-seuche*, Centralbl. f. Bacteriologie, Vol. VIII. 1890, pag. 289.

(3) Opera citata, pag. 461.

(4) Caneva, *Ueber die Bacterien der hämorragischen Septicämie*, Centralblatt f. Bacteriologie Vol. IX, 1891, pag. 557.

animale. E anaerobio facoltativo, e cresce bene anche alla temperatura dell'ambiente. Nella gelatina, per infissione, si sviluppa sotto forma di colonia grigiastra, prominente sulla superficie della gelatina (testa di chiodo): la gelatina non resta fluidificata, presenta fenditure da sviluppo di gas, e nelle culture vecchie assume attorno alla colonia una tinta brunastra. Cresce anche sulla patata e nell'agar, senza offrire nulla di caratteristico. Questo bacillo è patogeno specialmente pel topo, ed anche pel cane; è meno patogeno per la cavia, e non lo è affatto pel coniglio. Iniettato nei topi direttamente nel polmone vi produce un processo infiammatorio locale ed infezione generale.

Si colora facilmente colle soluzioni coloranti ordinarie; non si colora col metodo di Gram.

Gli stessi caratteri morfologici e di coltura offre un bacillo, che fu osservato la prima volta da Frisch nel *rinoscleroma*, che nei tessuti ammalati è pure provvisto di capsula, e che offre nelle culture gli stessi caratteri del bacillo di Friedländer, e spiega negli animali la stessa azione patogena, per quanto un po' più debole.

Se ne differenzia soltanto per ciò, che è provvisto di capsula anche nelle culture (Tav. VII, fig. 6) e si colora bene col metodo di Gram.

Nel tessuto ammalato i bacilli si trovano prevalentemente racchiusi entro grosse cellule jaline, speciali di quest'affezione, così-dette cellule di Mikulicz, dal nome di chi le ha per primo descritte, ma si trovano anche liberi nel tessuto e negli spazî linfatici. La presenza costante di tali bacilli nel rinoscleroma parla in favore della loro importanza patogenica, per quanto gli innesti fatti negli animali coi pezzi patologici e colle culture del bacillo non abbiano in essi riprodotto nulla di simile al rinoscleroma.

16. Proteo capsulato.

Isolato la prima volta dallo scrivente (1) da un caso di malattia dell'uomo, simile per decorso clinico e per reperto anatomico al carbonchio intestinale, questo microrganismo è stato in seguito osservato anche da Banti (2) in altri casi di malattia dell'uomo.

Appartiene alla famiglia dei batterî polimorfi, designati da Hauser (3) col nome di *Protei*, per indicare appunto la loro ca-

(1) Bordoni-Uffreduzzi, *Ueber den Proteus hominis capsulatus*, ecc. Zeitschr. f. Hygiene, Vol. III, 1887.
(2) Banti, *Sopra quattro specie nuove di Protei o bacilli capsulati*, Firenze, 1888.
(3) Hauser, *Ueber Fäulnissbacterien*, Leipzig, 1885.

ratteristica morfologica principale, che è la variabilità delle forme che essi presentano in diverse condizioni.

È da preferirsi il nome di « proteo » a quello semplicemente di « bacillo pleomorfo » che taluno (1) ha proposto, perchè tale microrganismo assume nel suo sviluppo non soltanto la forma bacillare diritta, ma eziandio quella ricurva a spirale e quella tondeggiante, e perchè il riprodursi di tali forme costituisce una particolarità costante del microrganismo.

Il proteo capsulato è immobile, anaerobio facoltativo, e cresce bene alla temperatura dell'ambiente, come a quella di 37° C. È provvisto di una capsula grande e reticolata, sia nelle culture (Tav. VII, fig. 7 e 8), in un certo periodo di sviluppo, come nell'organismo animale, e non forma spore.

Si sviluppa nella gelatina, senza fluidificarla, con un aspetto simile al bacillo di Friedländer; se l'innesto è fatto per infissione, si forma una striscia bianca lungo il canale d'innesto e una prominenza biancastra, lucente, a forma di testa di chiodo sulla superficie; se l'innesto è fatto per strisciamento, la colonia ha un aspetto nastriforme, rilevato, simile a cera, e scivola in basso nel fondo del tubo, riproducendosi continuamente sulla superficie della gelatina (Tav. IV, fig. 1). Se poi la cultura si fa in un'atmosfera di idrogeno, lo sviluppo si ha solo lungo il canale d'innesto, con formazione abbondante di gas, che produce fenditure numerose nella gelatina.

L'esame microscopico delle culture in gelatina rivela in esse la presenza di forme diverse, in proporzione variabile secondo il periodo di sviluppo. Esaminate dopo 24 ore, si trovano costituite in prevalenza da filamenti, diritti ed ondulati, taluni anche ripiegati a spirulina, e di grossezza ineguale nel loro decorso: con tali filamenti si trovano commiste numerose forme bacillari, più grosse di quelle del carbonchio e di varia lunghezza, ed altre forme tondeggianti, cocciformi, più scarse.

In questo primo periodo il microrganismo è provvisto di capsula in tutte le sue forme.

Proseguendo lo sviluppo, diminuisce sempre di più il numero dei filamenti, ed aumenta invece quello dei bacilli e delle forme tondeggianti; la capsula scompare, e finalmente nelle culture vecchie non si trovano più che bacilli tozzi e forme tondeggianti, irregolari.

Nelle culture fatte nell'agar, alla temperatura dell'ambiente, si

(1) Baumgarten, *Lehrbuch d. path. Mykologie*, 2.e Hälfte, 3.e Halbb. Lief. 2, 1890, pag. 863.

osservano press'a poco le stesse particolarità di forma ora descritte, mentre invece, se lo sviluppo avviene a 37° C., già fin da principio i filamenti sono scarsi e corti, e le culture appaiono quasi esclusivamente composte da bacilli corti e da forme tondeggianti, capsulate.

Lo stesso dicasi delle culture fatte nel siero di sangue.

Sulle patate il proteo si sviluppa rigogliosamente, anche alla temperatura dell'ambiente, e si notano le stesse particolarità e diversità di sviluppo sopra esposte, a seconda della temperatura ed a seconda dell'età delle culture. Havvi una sola differenza, ed è che qui il proteo non si trova mai provvisto di capsula, e nei filamenti si osservano numerosi e grossi rigonfiamenti, fusiformi o triangolari, che probabilmente sono da interpretarsi come forme degenerative.

Nel brodo, qualunque sia la temperatura di sviluppo, il proteo forma soltanto bacilli isolati e non filamenti.

Si colora bene colle soluzioni ordinarie dei colori basici d'anilina ed anche col metodo di Gram; nell'interno dei bacilli e dei filamenti colorati si scorgono numerosi spazî chiari, di varia grossezza, che non possono essere interpretati come spore, perchè le culture, in qualunque periodo del loro sviluppo, mostrano sempre lo stesso grado debole di resistenza all'azione degli agenti fisici e chimici distruttori.

Il proteo capsulato è patogeno pei comuni animali d'esperienza, ma specialmente pel piccolo topo bianco e per il cane.

L'innesto sottocutaneo di una piccola quantità di cultura uccide i topi in 24-48 ore, cogli stessi fenomeni dell'infezione carbonchiosa. La milza è grossa e scura, il sangue fluido e nerastro, e contenente un grandissimo numero di microrganismi, sotto forma di bastoncini, isolati o riuniti a due, circondati di capsula. La fig. 9 della Tav. VII rappresenta una sezione dell'intestino di topo, i cui vasi sanguigni contengono in gran numero i bastoncini capsulati. Se però la necroscopia si fa qualche ora dopo la morte, si trovano, oltre i bastoncini, abbondanti i filamenti come nell'uomo.

La virulenza di questo microrganismo pel topo può soltanto essere paragonata a quella del bacillo carbonchioso, giacchè bastano pochi esemplari di esso, introdotti sottocute sospesi in una goccia di liquido, per produrre l'infezione e la morte.

Se i topi sani mangiano il cadavere di un topo infetto, ammalano e muoiono anch'essi d'infezione proteica.

Nel cane il proteo esercita un'azione veramente infettante, se inoculato per via sottocutanea, con fenomeni di edema sottocutaneo e necrosi progressiva della cute; se introdotto invece per la via degli organi digerenti o nel sangue, produce dapprima fenomeni di

intossicazione (vomito e diarrea), ai quali tien dietro poscia una vera infezione, caratterizzata da abbondante sviluppo dei microrganismi, muniti di capsula.

Nel coniglio e nella cavia esercita un'azione patogena molto minore, e prevalentemente tossica, piuttosto che infettante. In questi animali il microrganismo non appare capsulato.

Nell'uomo l'infezione si svolge coi caratteri di una setticemia, simile a quella da bacillo carbonchioso. Si trovano tumefatte le ghiandole linfatiche, le mesenteriche, le peribronchiali; e nel sangue, come nelle glandole, si trova abbondante il microrganismo, sotto forma di bacilli e di filamenti non capsulati.

Non si può dire che nell'uomo l'infezione da proteo capsulato sia frequente, perchè finora se ne sono descritti pochi casi soltanto. Il proteo appartiene indubbiamente alla categoria dei parassiti facoltativi, e con tutta probabilità non è in grado di svolgere un'azione patogena, se non in determinate circostanze, finora non conosciute.

Questo microrganismo non è stato trovato finora nel cadavere, nè normalmente, nè in altri casi di malattia dell'uomo, a differenza del proteo volgare di Hauser, il quale è uno dei comuni agenti della putrefazione cadaverica (1).

17. Bacillus coli.

Con questo nome fu la prima volta distinto un bacillo isolato da Escherich (1) nelle feci dei bambini lattanti, e riconosciuto poscia come uno dei più comuni commensali, che alberghiamo nel nostro intestino. Esso si trova egualmente nel contenuto intestinale degli animali, ed in questi ultimi tempi ha acquistato un'importanza speciale, perchè si è voluto metterlo in rapporto coll'eziologia del tifo addominale, ed anche perchè si è trovato realmente essere la causa di numerosi processi morbosi anche nell'uomo. Senza ritornare su quella prima questione, già discussa a proposito del bacillo del tifo, diciamo qui che nell'uomo è stato riconosciuto causa non soltanto di processi suppurativi, situati in località prossime all'intestino (peritoneo, fegato, ecc.), ma anche di processi morbosi gravi dell'intestino (catarro intestinale, dissenteria, colèra nostrano), del-

(1) Bordoni-Uffredduzzi, *I Protei quali agenti di intossicazione e d'infezione*, Memorie della R. Accad. dei Lincei, Vol. VII, 1891. — Hauser, *Ueber das Vorkommen von Proteus vulgaris bei einer jauchig-phlegmonösen Eiterung*. Münch. med. Woch. N.° 7, 1892.

(2) Escherich, *Die Darmbacterien des Säuglings*, ecc. Fortschr. d. Medicin, N.° 16, 1885.

l'apparecchio genito-urinario (cistite, pielonefrite), delle meningi e del polmone.

È un bacillo corto, mobile, provvisto di parecchie ciglia ondulate (Ferrati, Dunbar), polimorfo, non sporigeno, che si colora facilmente coi metodi comuni e resta decolorato col metodo di Gram.

Nelle culture sui mezzi solidi si manifesta per lo più come un bacillo corto e tozzo (lungo 2-3 μ e largo 0,4-0,6 μ), ad estremità arrotondate, spesso riunito a due, e talora anche sotto forma di filamenti: nell'intestino si trova sempre sotto forma di bacilli isolati, più sottili che quelli delle culture, e nelle culture vecchie (gelatina, patate) invece si manifesta con un aspetto quasi cocciforme.

È prevalentemente aerobio, ma cresce anche lungi dall'O nei mezzi contenenti glucosio. Cresce nella gelatina, senza fluidificarla, e la sua cultura ha un aspetto simile a quella del bacillo del tifo; nell'agar e nel siero la cultura è bianca ed opaca. Sulle patate si sviluppa abbondantemente, formando per lo più uno strato giallo-sporco, o giallo-verdastro. Nel brodo si sviluppa intorbidandolo e producendo, fra gli altri gas, anche idrogeno solforato. — Le culture emanano tutte un odore fecaloide, o di smegma. — Coagula il latte con sviluppo di acido, e produce fermentazione nelle soluzioni zuccherine. Cresce bene fino alla temperatura di 46° C. Esso si sviluppa nei brodi fenicati a 42° C., e decolora l'agar tinta colla fucsina, come il bacillo del tifo (1).

Si differenzia però alquanto da questo pel suo potere patogeno più spiccato verso i comuni animali di esperienza. Esso infatti, inoculato nelle vene della cavia e del coniglio, ne produce la morte in 2-3 giorni coi fenomeni di diarrea e stato comatoso. All'autopsia si trova l'intestino molto iperemico, si trova spesso essudato peritoneale, e nel sangue abbondantissimi i bacilli. Iniettato sottocute produce ascessi, e nel peritoneo peritonite e morte. I topi sono refrattarî, o meno sensibili, per questa infezione. Questo microrganismo si è trovato talvolta essere causa di malattie spontanee anche negli animali (Netter, Jensen).

Si conoscono molti altri bacilli aventi caratteri simili a quelli sopradescritti, e che si possono perciò considerare come varietà di un'unica specie. Fra questi menzioniamo principalmente un bacillo trovato comunemente da Nencki (2) nell'intestino tenue dell'uomo,

(1) Una minuta descrizione delle proprietà biologiche di questo microrganismo, le quali del resto rassomigliano molto a quelle del bacillo del tifo, si può leggere nel lavoro riassuntivo di Kiessling, *Das bacterium coli commune*, Hygienische Rundschau 1893, N. 16 e 17.

(2) Nencki, *Die isomeren Milchsäuren als Erkennungsmittel einzelner Spaltpilzarten*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. IX, 1891, pag. 304.

e che si distingue dal *B. coli*, perchè questo produce dallo zucchero acido lattico, e l'altro acido paralattico, il *bacillo napolitano* di Emmerich, isolato da questi (1) dai cadaveri dei colerosi, il *bacillo piogeno fetido*, trovato di Passet (2) nel pus di un ascesso perirettale, ed un bacillo isolato da Gaffky (3) dal contenuto intestinale di persone ammalate di enterite acuta in seguito all'ingestione di latte crudo, proveniente da una vacca diarroica, nelle cui feci si conteneva abbondante lo stesso bacillo.

Anche quegli altri microrganismi, descritti col nome di « tifosimili », devono con ogni probabilità essere ascritti al gruppo rappresentato dal *Bacillus coli*.

18. Vibrione del colèra.

Scoperto da Koch, il quale nel 1883 lo trovò costantemente nell'interno dei cadaveri di colerosi, da lui sezionati in Alessandria d'Egitto e nelle Indie, questo microparassita è stato trovato costantemente nel colèra in tutte le diverse regioni del mondo, ed è stato anche, in cultura netta, innestato negli animali, ed anche nell'uomo, con risultato positivo; cosicchè ora si può affermare con tutta certezza che la causa del *colèra asiatico* risiede nello sviluppo di questo parassita nel nostro organismo.

Tali microrganismi, chiamati da Koch (4) per la loro forma speciale, ricurva, « bacilli-virgola » (Tav. VII, fig. 2 e 3), sono lunghi la metà o i $^2/_3$ circa dei bacilli tubercolari, ma sono più grossi e leggermente ripiegati a mo' di una virgola. Talora due individui si trovano ravvicinati nello stesso senso ed appaiono sotto forma di un semicerchio, oppure sono riuniti in senso inverso ed hanno l'aspetto di una *S*. Nelle culture assumono talora anche un altro aspetto, di filamenti ripiegati a spirale, simili agli spiroceti della febbre ricorrente. Per questo stadio speciale di sviluppo sarebbero da porsi fra gli spirilli, ma siccome la forma di lunghe spirali non è costante, e risulta dalla riunione di parecchi individui (come i filamenti, così detti di « leptotrix », nello sviluppo dei bacilli), così è più opportuno chiamarli semplicemente « vibrioni ».

La formazione di spirilli si osserva specialmente allorquando,

(1) Emmerich, *Ueber die Cholera in Neapel und die in Choleraleichen und Cholerakranken gefundenen Pilz*, Archiv f. Hygiene, II, pag. 417.

(2) Passet, *Ueber Mikroorganismen der eitrigen Zellgewebsentzündung des Menschen*, Fortschr. d. Medicin, N.° 2 e 3, 1885.

(3) Gaffky, *Erkrankungen an infectiöser Enteritis in Folge des Genussess ungekochter Milch*, Deutsche med. Wochenschr. 1892, pag. 297.

(4) Koch, *Die Conferenz zur Erörterung der Cholerafrage*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 32, 1884.

non essendo le condizioni di vita in cui si trova il microrganismo (temperatura, composizione del mezzo nutritivo) molto favorevoli pel suo sviluppo, viene ritardato il processo di scissione e di separazione dei singoli individui neoformati: la produzione degli spirilli rappresenterebbe adunque un fenomeno di degenerazione incipiente.

La forma di questo microrganismo è tutt'altro che costante; non di rado infatti accade di trovare accanto alle forme ricurve bacilli perfettamente diritti ed anche filamenti, oppure forme corte e tozze, e senza tendenza a formare spirilli.

Il vibrione colerigeno, sia isolato, come sotto forma di spirilli, è dotato di vivaci movimenti, dovuti all'esistenza di un solo ciglio vibratile, lungo e tortuoso, situato ad una delle estremità del microrganismo, come è stato descritto da Löffler e da altri. Alcune varietà di questo vibrione (di Massaua, di Calcutta) sarebbero invece provviste di 4 ciglia, due a ciascuna estremità della cellula batterica.

Nicolle e Morax (1), i quali hanno descritto una tale particolarità morfologica, suggeriscono una buona modificazione al metodo di Löffler per la colorazione delle ciglia, la quale consiste essenzialmente nel far subire ai preparati l'azione del mordente (inchiostro di fucsina) per 3 o 4 volte successive, riscaldando ogni volta il vetrino sopra una piccola fiamma per pochi secondi (10), fino a che appaiono appena i vapori visibili, e lavando ogni singola volta il preparato con acqua accuratamente. Per colorare poi serve bene egualmente la soluzione Ziehl di fucsina o quella Ehrlich di genziana, riscaldando il vetrino una o due volte per 15 secondi; la colorazione si fa senza lavare coll'alcool il preparato, dopo avergli fatto subire l'azione del mordente.

Per fare i preparati si prende una cultura in agar, di poche ore, la si diluisce in acqua comune (non distillata), in modo da avere un liquido leggermente torbido, e se ne depone una goccia su di una serie di coproggetti ben puliti e arroventati in precedenza sulla fiamma, lasciando disseccare lo straterello di liquido al riparo dalla polvere e sottoponendolo alle operazioni sopra descritte, senza fissarlo col calore, come si fa d'ordinario.

Riguardo all'esistenza di una fase di sporificazione, non sono ancora d'accordo gli osservatori; giacchè da un lato Koch, e con lui la maggior parte dei batteriologi, negano assolutamente che il vibrione colerigeno formi spore, mentre dall'altro Hueppe (2) sostiene di avere osservato nelle culture vecchie del microrganismo una fase di *artrosporificazione* completa, fino, cioè, alla riproduzione della forma bacillare dalle artrospore.

(1) Nicolle et Morax, *Técnique de la coloration des cils*, Annales de l'Institut Pasteur, T. VII, 1893, pag. 554.

(2) Hueppe, *Ueber die Dauerformen der sogenannten Kommabacillen*, Fortschr. d. Medicin, N.° 13, 1885.

Senza volere dare in merito un giudizio assoluto, diciamo però che vi è una serie di fatti, relativi alle proprietà biologiche, i quali sono in aperta contradizione coll'esistenza di una forma resistente del vibrione colerigeno; e tali fatti sono appunto la sua poca resistenza all'azione nociva dei diversi agenti fisici e chimici ed alla concorrenza vitale cogli altri microrganismi. Oltre a ciò, secondo le osservazioni di Kitasato (1), le presunte artrospore di Hueppe non sarebbero altro che forme degenerative, che si riscontrano nelle vecchie culture. A questo proposito diciamo che le culture del vibrione, e specialmente quelle in gelatina, contengono spesso forme anomale di sviluppo, irregolarmente rotonde o sferiche, le quali sono state anche da altri erroneamente interpretate come organi di riproduzione (Ferran, Dowdeswell). Si noti però che, anche quando esistono tali forme, le culture non mostrano possedere un grado di resistenza maggiore che in condizioni ordinarie.

Questo microrganismo si sviluppa entro limiti di temperatura abbastanza estesi, da 15 a 42° C., e quindi tanto alla temperatura ordinaria dell'ambiente, come in quella del termostato, a 37° C.; quest'ultima temperatura è però più favorevole della prima. Cresce bene a contatto dell'aria, ma si sviluppa anche nei mezzi anaerobî, senza però che in tali condizioni si produca, come vorrebbe Hueppe, un massimo di sostanze tossiche (Gruber (2)). Vegeta in tutti i mezzi nutritivi, comunemente adoperati, e in alcuno di questi in maniera caratteristica.

Così nella gelatina è speciale la sua maniera di svilupparsi, tanto nelle colonie giovani osservate al microscopio nelle culture piane, come nell'innesto per infissione fatto nella gelatina contenuta nei tubi da saggio.

Le piccole colonie, osservate al microscopio con un ingrandimento di 80-100 diam., appaiono dapprima sotto forma di ammassi granulari, splendenti, come se fossero formati da polvere di vetro, di colorito leggermente grigiastro e a contorni irregolari. In seguito la colonia appare circondata da un alone chiaro, prodotto dalla fluidificazione della gelatina (Tav. III, fig. 6), ed assume un colorito leggermente roseo, caratteristico. Accanto a queste colonie, che chiameremo « tipiche », se ne sviluppano però spesso altre di aspetto così diverso, che non potrebbero col solo esame fatto a debole ingrandimento essere riconosciute per colonie del vibrione colerigeno.

Osservate ad occhio nudo, le stesse colonie appaiono dapprima

(1) Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 5.°, 1888, pag. 134 e Vol. 6.°, 1889, pag. 11.
(2) Gruber u. Wiener, *Cholera-Studien*, Archiv f. Hygiene, Vol. XV, 1892, pag. 241.

sotto forma di punticini biancastri, e più tardi, una volta cominciata la fluidificazione della gelatina (2.ª-3.ª giornata), assumono l'aspetto di bollicine d'aria, dovuto al fatto che la gelatina si fluidifica più rapidamente nel senso della profondità che alla periferia, e si forma così un piccolo imbuto, anche per causa dell'evaporazione, nel fondo del quale si trova la colonia propriamente detta.

L'aspetto imbutiforme è specialmente manifesto e caratteristico nelle culture fatte per infissione nella gelatina entro i tubi da saggio. Quivi la fluidificazione attorno al canale d'innesto si fa più rapida alla superficie, e va gradatamente decrescendo verso il basso, in modo che ne risulta la forma di un imbuto colla base in alto, che resta incavata pel fatto dell'evaporazione della gelatina fluidificata (bolla d'aria): nella parte centrale e più ristretta dell'imbuto si raccoglie la colonia del microrganismo, sotto forma di filamento grigiastro, ripiegato a spira (Tav. IV, fig. 4).

Questa maniera di crescere nella gelatina si può dire soltanto fino ad un certo punto caratteristica del vibrione colerigeno, giacchè vi sono anche altri microrganismi, fra i quali citiamo principalmente il bacillo virgolato di Finkler e Prior, quello di Deneke e l'altro di Metschnikoff, i quali, innestati per infissione, fluidificano la gelatina in maniera simile a quello del colèra, per quanto più rapidamente e in modo meno regolare (Tav. IV, fig. 3).

La forma di imbuto si conserva, naturalmente, fino ad un certo punto dello sviluppo; giacchè, col progredire di questo, la fluidificazione della gelatina si fa, a poco, a poco, completa, e la cultura si trasforma in una massa liquida, opaca, coperta spesso, ma non sempre, da una pelliccola.

È da notare che talvolta lo sviluppo del vibrione colerigeno nella gelatina si mostra alquanto diverso da quello ora descritto, che corrisponde alla descrizione classica di Koch. Si è visto infatti che la rapidità di fusione della gelatina, e quindi la forma dell'imbuto, possono variare a seconda dell'origine del bacillo, e quindi probabilmente secondo la sua virulenza, come anche secondo il contenuto percentuale di gelatina e il grado suo di alcalinità. Come si è già detto, è vario anche l'aspetto delle colonie giovani nelle culture piane; anzi, secondo Dahmen (1), le colonie del vibrione colerigeno si presenterebbero sempre sotto due forme, distinte fra loro non solo pei caratteri macroscopici e microscopici, ma anche per le proprietà fisiopatogeniche.

(1) Dahmen, *Ueber gewisse Befruchtungsvorgänge bei den Vibrionen* Koch, Finkler *und* Prior, u. s. w., Centrablatt f. Bacteriologie, Vol. 14, 1893, pag. 43.

Fatto sviluppare sull'agar, disposta nei tubi obliquamente, il vibrione colerigeno vi forma uno strato superficiale bianco-grigiastro e splendente, come sul siero di sangue. Nelle culture piane di agar le colonie superficiali si presentano di un colore grigio-brunastro, chiaro, abbastanza caratteristico.

Il vibrione colerigeno cresce bene anche sulla superficie del siero di sangue solidificato, con aspetto simile a quello della cultura in agar: il siero viene da esso lentamente fluidificato.

Sulle patate cresce tanto a temperatura elevata, nel termostato, come anche a quella dell'ambiente (non però al di sotto di 20° C.), sotto forma di strato giallo-scuro, simile a quello della cultura del bacillo moccioso. Secondo alcuni osservatori, sulle patate comuni, che hanno reazione acida, il vibrione non si sviluppa; secondo le mie osservazioni invece, anche se la reazione delle patate è debolmente acida, lo sviluppo si verifica, per quanto lentamente; è però sempre più rigoglioso nelle patate impregnate di una soluzione di soda $^1/_2$ %, o di cloruro sodico 2 % (Voges (1)).

Nel brodo si sviluppa intorbidandolo e formando talvolta, ma non sempre, una pellicola sulla sua superficie. Il brodo che contiene peptone, oppure anche semplicemente la soluzione acquosa di peptone a 1 %, in cui si è fatto sviluppare il vibrione colerigeno nel termostato a 37° C., si colora in rosso mediante l'aggiunta di piccole quantità di acido solforico chimicamente puro, privo cioè di acido nitroso, dando luogo così alla produzione del così detto « rosso colerico », che in principio si ritenne esclusivamente caratteristico di queste culture. Per agevolarne la riuscita, si può riscaldare leggermente il tubo da saggio dopo l'aggiunta dell'acido. Anche le culture in gelatina, allorquando la fluidificazione di questa è già avanzata, sono in grado di fornire la stessa reazione.

Salkowski (2) ha dimostrato che una tale reazione chimica, scoperta da Poehl (3) ed applicata poscia da Bujwid (4) e da Dunham (5) per la diagnosi differenziale del vibrione colerigeno, non è altro che la reazione dell'indolo, la quale perciò lungi da essere speciale del solo vibrione colerigeno, sarebbe invece comune a tutti gli altri microrganismi che producono indolo nelle culture.

(1) Voges, *Ueber das Wachsthum der Cholerabacillen auf Kartoffeln,* Centrablatt f. Bacteriologie, Vol. 13, 1893, pag. 543.

(2) Salkowski, *Ueber das Choleraroth, und das Zustandekommen der Cholerareaction*, Virchow's Archiv Vol. 110, 1887, pag. 366.

(3) Poehl, *Chemico-biologie of microorganisms and ptomaines*, The Lancet, 1886, pag. 830.

(4) Bujwid, *Zur Frage von Cholerareaction,* Centralbl. f. Bakteriol. Vol. III. 1888, pag. 169.

(5) Dunham, *Zur chemischen Reaction der Cholerabacterien*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 2.° 1887, pag. 337.

La reazione dell'indolo però non si produce, se non in presenza dell'acido nitroso (Alì-Cohen (1)), il quale secondo Petri (2) si rende libero nelle culture di vibrione colerigeno, in seguito all'aggiunta dell'acido, dai nitriti che quel microrganismo produce riducendo i nitrati del mezzo di nutrizione. E per ciò appunto che la reazione non si produce nelle culture dei vibrioni consimili di Deneke, e di Finkler e Prior, i quali non hanno la proprietà di ridurre i nitrati, per quanto anch'essi producano indolo. E difatti nelle culture di questi microrganismi si può ottenere la colorazione rossa, ma mediante l'aggiunta dell'acido nitroso, o di un miscuglio di acido solforico e nitrito potassico. Sonvi però altri vibrioni, e fra questi quello di Metschnikoff, i quali hanno in comune con quello colerigeno la proprietà di ridurre i nitrati; e quindi anche nelle culture di essi appare la colorazione rossa per opera dell'acido solforico puro, come in quelle del colèra.

Non possiamo quindi convenire con quanto afferma Koch (3), che, cioè, nessuno dei bacilli ricurvi, simili a quello del colèra, offra la stessa reazione del rosso colerico.

La reazione del rosso colerico è dovuta adunque alla proprietà che ha il vibrione colerigeno di produrre contemporaneamente indolo dal peptone e nitriti dai nitrati, contenuti nel materiale di nutrizione, per cui, aggiungendo alla cultura l'acido solforico puro, l'acido nitroso messo in libertà reagisce sull'indolo e dà la caratteristica colorazione rossa.

Perchè la reazione si verifichi, occorre adunque che il materiale di cultura contenga peptoni e nitrati, e perchè abbia il valore diagnostico che le si attribuisce, è naturalmente necessario che nè il materiale di cultura, nè l'acido solforico contengano traccie di nitriti o di acido nitroso, ed oltre a ciò che la cultura sia pura, per escludere l'influenza di altri microrganismi.

Il mezzo migliore adunque, per ottenere questa reazione, si è di coltivare i bacilli a 37° C. in una soluzione di peptone 1 % con aggiunta di cloruro sodico, chimicamente puro, ½ %; alcuni consigliano di elevare la quantità del peptone a 2 % e quella del cloruro sodico a 1 %. La reazione si ottiene dopo un tempo variabile, da 6 ore fino a 24 ore e più di permanenza in termostato. Si è trovato inoltre che non tutte le qualità di peptone servono ugualmente, e che anzi con qualcuna di esse la reazione non si ottiene.

(1) Alì-Cohen, *Zur Bedeutung des sogenannten Cholerarothes*, Fortschritte d. Medicin, N.° 17, 1887.

(2) Petri, *Reduction von Nitraten durch die Cholerabacterien*, Centralbl. f. Bacteriol. Vol. V, 1889, pag. 561.

(3) Koch, *Der augenblickliche Stand der Choleradiagnose*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 14, 1893, pag. 319.

Bleisch (1) ha per primo dimostrato che una delle ragioni principali di tal fatto è il contenuto variabile del peptone in nitrati, giacchè, se nelle colture si trova acido nitroso (nitriti) in troppo piccola, o in troppo grande quantità, la reazione non si produce. Egli consiglia perciò di adoperare un peptone purissimo, privo affatto di nitrati e di nitriti (quello di Witte di Rostock, leggermente alcalino) e di aggiungervi le altre sostanze che sono necessarie, nella quantità più propizia per lo sviluppo del vibrione e pel prodursi della reazione, e cioè:

Peptone	Gr.	2,00
Cloruro di sodio purissimo . . .	»	0,5
Acqua distillata	»	100,00

Soluzione di nitrato potassico, purissimo (0,08 %), da 30 a 50 goccie.

La soluzione si fa bollire, si filtra, si distribuisce in tubi da saggio e si sterilizza. Già dopo 4-6 ore di permanenza delle culture in termostato si può ottenere in questo mezzo distinta la reazione del rosso.

Siccome però in pratica è difficile trovare un peptone alcalino e privo affatto di nitrati (e questo vale anche per alcuni peptoni provenienti della fabbrica di Witte), così miglior consiglio si è di preparare la soluzione di peptone e di cloruro sodico puro (privo di nitrati e di nitriti), di distribuirne 10 cc. in una serie di 15 tubi da saggio e di aggiungere a 14 di essi da 1 a 14 goccie di una soluzione di nitrito potassico a 0,4 %, lasciandone uno senza alcuna aggiunta. Seminando nei tubi così preparati una cultura pura di vibrione colerigeno, ed aggiungendo ad essi, dopo 24 ore di permanenza in termostato, qualche goccia di $SO^4 H^2$ puro, si vedrà quale è la proporzione più adatta di nitrito potassico da aggiungere al peptone che si possiede, per avere distinta la reazione del rosso colerico. Fatto questo, resta ancora da stabilire quale è il tempo più breve nel quale si manifesta la reazione dopo fatto il trapianto.

Il brodo e gli altri mezzi di nutrizione non sono molto adatti per la reazione, perchè possono contenere nitriti, e trarre quindi in inganno l'osservatore.

Un'altra causa della mancanza della reazione del rosso colerico, dovuta a impurità del peptone, è stata trovata da Gorini (2),

(1) Bleisch, *Ueber einige Fehlerquellen bei Ausstellung der Cholerareaction und ihre Vermeidung*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 14, 1893, pag. 103.

(2) Gorini, *Sulla scelta dei peptoni per la diagnosi batteriologica del colèra*, Giornale della R. Società di Igiene. N.° 5. 1893.

il quale, ricercando il motivo per cui col peptone di Erba di Milano la reazione del rosso non si ottiene, ha potuto dimostrare che ciò dipende dalla presenza nel peptone di glucosio, il quale impedisce la formazione da questo dell'indolo. È necessario quindi saggiare prima il peptone in soluzione acquosa col reattivo di Fehling, e adoperarlo per la reazione del rosso colerico solamente allorquando non si ha nè la riduzione, nè la scolorazione del liquido reattivo, ma si ha soltanto una colorazione violetta, persistente all'ebollizione (*biuret*).

Un altro mezzo di nutrizione, molto adatto per lo sviluppo del vibrione di Koch, è il *latte sterilizzato*, nel quale cresce abbondantemente, secondo Koch e Gaffky senza coagularlo, e secondo Fränkel (1) invece coagulandolo lentamente con produzione di acido, e conservandosi in esso vivente anche dopo 8 giorni. Nel latte comune lo sviluppo del vibrione è dapprima abbondante, ma in seguito cessa, non appena il latte comincia a diventare acido, finchè dopo 2-3 giorni la vita si spegne (1). Ciò è importante per l'igiene, giacchè può il latte in quel primo periodo farsi veicolo dell'infezione colerosa.

Ma oltre il latte, anche le frutta e le altre sostanze, che fanno parte della nostra alimentazione, possono servire come substrato per lo sviluppo, e come mezzo per la diffusione dei germi colerici. La maniera di comportarsi di questi microrganismi sulle sostanze alimentari, studiata già da tempo parzialmente da diversi osservatori (Tizzoni e Cattani (3), Babés (4), Celli (5), ecc.), è stata sottoposta ad uno studio sistematico ed accurato, esteso anche alle bevande di uso più comune, nell'Istituto d'igiene imperiale di Berlino (6), specialmente nell'intento di stabilire quanto tempo i germi del colèra si mantengono viventi in quelle sostanze.

Da queste ricerche è risultato che sulla superficie delle frutta quei germi, se allo stato secco si mantengono viventi per 1 giorno o 2 (pesche) e se allo stato umido fino a 7 giorni, sulla polpa delle frutta si mantengono viventi per un tempo diverso, a seconda specialmente del grado loro di acidità, più a lungo nelle

(1) Fränkel E., *Zur Biologie des Kommabacillus*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 46, 1892.

(2) Kitasato, *Das Verhalten der Cholerabacterien in der Milch*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. V, 1888, pag. 491.

(3) Tizzoni e Cattani, *Untersuchungen über Cholera*, Centralblatt f. d. med. Wissensch. 1886, N.° 43, pag. 769.

(4) Babés, *Untersuchungen über Koch's Kommabacillus*, Virchow's Archiv, Vol. 99, 1885, pag. 145.

(5) Celli, *Delle nostre sostanze alimentari considerate come terreno di cultura di germi patogeni*, Annali dell'istituto d'igiene di Roma 1889, Vol. II, pag. 6.

(6) Friedrich, *Beiträge zum Verhalten der Cholerabacterien auf Nahrungs- und Genussmitteln*, Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamte, Vol. 8, 1893, pag. 465.

pere (4 giorni) e nei cetriuoli (7 giorni). Delle bevande il vino è quello che li uccide più rapidamente (il vino bianco in 5 minuti, quello rosso in 15); viene in seguito il caffè (2 ore), la birra (3 ore) ed il thè, il quale però agisce più o meno prontamente a seconda della concentrazione dell'infuso (al 4 % li uccide in 1 ora, al 3 % in 1 giorno, al 2 % in 4 giorni). Nella carne di pesce tenuta al fresco si trovarono morti dopo 2 giorni, nell'aringa affumicata o salata dopo 1 giorno, nel caviale tenuto alla temperatura ordinaria dopo 1 giorno e in quello tenuto in ghiacciaia dopo 4-8 giorni, nelle diverse specie di confetti dopo 24 ore, nel tabacco secco dopo 1 ora e mezza e in quello umido dopo 7 ore.

Sulle nostre sostanze alimentari i germi del coléra possono arrivare in diverse maniere, ma specialmente per mezzo delle mani e degli utensili sporchi, per mezzo della polvere e per opera delle mosche.

L'importanza delle mosche, come mezzo di diffusione dei germi infettanti, venne la prima volta sperimentalmente dimostrata da Grassi (1), il quale potè constatare la presenza, non solo di microrganismi, ma anche di uova di elminti (botriocefalo, tenia) nel contenuto intestinale delle mosche, che si erano posate su materiali artificialmente inquinati con quei germi. In seguito Tizzoni e Cattani (2) dimostrarono la presenza dei vibrioni colerigeni negli escrementi delle mosche lasciate a contatto delle culture, ed ora si è anche potuto constatare che le mosche, le quali si sono posate sulle feci o sulle biancherie sporche, possono trasportare i germi colerici, aderenti al loro corpo, e ancora viventi dopo qualche ora, sulle sostanze alimentari. Oltre a ciò, si è anche visto che i vibrioni colerigeni mangiati dalle mosche si trovano vivi e virulenti nelle loro dejezioni fin dopo 3-4 giorni, cosicchè è probabile che nell'intestino di questi insetti non solo si conservino, ma si moltiplichino eziandio (Sawtschenko (3)).

Altrettanto interessante per l'igiene è il modo di comportarsi di questo microrganismo nell'acqua. Se si tratta di acqua comune sterilizzata, in questa può il vibrione colerigeno non solo restare in vita, ma svilupparsi anche e mantenersi vitale per parecchi mesi: mentre invece nell'acqua non sterilizzata dopo pochi giorni scompare, sopraffatto dalla lotta cogli altri batterî. Questo almeno è il risultato quasi concorde delle osservazioni numerose fatte in proposito nei laboratorî. In natura però sembra non avvenga sempre così, giacchè Koch ha trovato abbondante il vibrione colerigeno nell'acqua di uno stagno, dove gli Indiani gettavano le materie di

(1) Grassi, *I maleficî delle mosche*, Gazzetta degli Ospedali, 1883, N. 59, pag. 467.
(2) Centralbl. f. d. med. Wissenschaften, 1886, pag. 771.
(3) Sawtschenko, *Die Beziehung der Fliegen zur Verbreitung der Cholera*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. XII, 1892, N. 25.

rifiuto, e dove in pari tempo attingevano l'acqua per bere; e Nicati e Rietsch (1) nell'acqua sporca del porto di Marsiglia lo avrebbero trovato vivente fin dopo 81 giorni.

La maniera di comportarsi di questo microrganismo nell'acqua è stata oggetto di molti studî, perchè l'acqua rappresenta indubbiamente uno dei veicoli principali di diffusione nella malattia, come si è potuto dimostrare con esempî molto dimostrativi anche nell'ultima epidemia che ha colpito la Germania (2). Sono specialmente le acque superficiali, di stagno, di fiume e di torrente, quelle che più facilmente possono restare inquinate dal germe colerico, sia per mezzo del contenuto delle fogne che in esse si riversa, sia per mezzo della biancheria sporca che vi si lava, e sia finalmente per mezzo delle barche o bastimenti che vi navigano, i quali, o per via delle feci dei malati che si trovano a bordo, o per via dell'acqua inquinata, che accolgono nella sentina, propagano facilmente l'infezione da uno in altro luogo. Si è visto infatti in parecchi casi propagarsi l'infezione precisamente per quest'ultima via.

La presenza del vibrione colerigeno nell'acqua è stata dimostrata parecchie volte; all'esempio sopracitato di Koch si possono aggiungere quello di Pasquale (3), che lo ha trovato nell'acqua di un pozzo a Massaua, quello di Fränkel (4), che l'ha trovato nell'acqua del porto di Dortmund, ed altri anche che sarebbe superfluo ricordare.

Per la ricerca del vibrione nelle acque il metodo ordinario di Koch è stato abbandonato, perchè insufficiente per lo scopo; e si usa invece, con molto vantaggio, un altro metodo, che consiste nel mettere in una serie di 10 boccette di Erlenmeyer 100 cc. dell'acqua da esaminare, aggiungervi 1 % di peptone e 1 % di cloruro sodico (secondo Metschnikoff anche 2 % di gelatina), e tenerle a 37° C.; dopo 10, 15 e 20 ore si fanno culture isolanti, col materiale tolto dalla superficie del liquido, nella gelatina o nell'agar. Con questo metodo, anche se in 1 litro d'acqua esisteva soltanto qualche esemplare di vibrioni colerigeni, si riesce a metterli in evidenza.

Per completare tale ricerca, bisogna poi fare la diagnosi differenziale dagli altri vibrioni consimili che si possono trovare nell'acqua, e dei quali furono già isolati parecchi esemplari da diversi

(1) Nicati e Rietsch, *La vitalité du microbe du Choléra*, Revue scientifique, N.° 9, 1885.

(2) Tali esempî si trovano estesamente riferiti nel lavoro di Koch, « *Wasserfiltration und Cholera* », Zeitschr. f. Hygiene. Vol. 14, 1893, pag. 393.

(3) Giornale medico del R. esercito e della R. marina, 1891.

(4) Deutsche med. Wochenschr. N.° 41, 1892.

osservatori: ma di ciò si dirà estesamente a proposito dell' esame batteriologico delle feci sospette, dove pure sono stati trovati microrganismi simili a quelli del colèra.

Nella concorrenza vitale cogli altri microrganismi il vibrione colerigeno si mostra diversamente resistente, specialmente a seconda delle condizioni diverse del mezzo in cui si trova. Difatti Kitasato (1), mescolando culture di colèra, nei diversi mezzi di nutrizione, colle culture pure di molti altri microrganismi patogeni e non patogeni, ha potuto osservare che sono pochi quelli che riescono a sopraffarlo e ad ucciderlo in breve tempo, e che anzi molti di essi hanno la peggio e restano distrutti in pochi giorni. Tale è il caso del bacillo del carbonchio, il quale resta ucciso in 10-14 giorni per opera dello sviluppo del vibrione colerigeno nelle culture.

Nelle feci lasciate a sè invece, secondo alcuni osservatori, i vibrioni scomparirebbero assai presto, in 4 giorni al più, mentre secondo altri (2) se ne può dimostrare la presenza fino a putrefazione avanzata (da 4 a 15 giorni); secondo Lubarsch (3) anzi i vibrioni colerigeni si possono nelle feci anche moltiplicare, e sono dimostrabili in esse fin dopo 20-22 giorni. È bene ricordare che le condizioni dell'esperimento di questi ultimi osservatori, i quali hanno fatto le osservazioni nella diarrea colerica, sono più conformi a quelle naturali, che non quelle degli altri, i quali mescolavano con feci normali il prodotto delle culture pure del microrganismo.

Anche più a lungo che nelle feci può il vibrione colerigeno mantenersi vivente nella biancheria da esse inquinata; giacchè, se questa si sciorina all'aria e si dissecca, i vibrioni muoiono presto, ma se invece si tiene ravvolta e in luoghi umidi e freschi, si possono conservare viventi fin 3-4 settimane e fors'anco di più.

Comunque sia, certo è che il vibrione del colèra può trovare anche nel mondo esterno condizioni favorevoli pel suo sviluppo, specialmente poi nei paesi dove la malattia regna endemica; esso appartiene adunque alla classe dei parassiti facoltativi.

Questo vibrione produce, sviluppandosi, sostanze velenose di diversa natura, alcune delle quali sono state anche isolate dalle culture (Brieger e Fränkel, Petri). Il veleno principale che esso produce non è però ancora stato isolato, e, secondo le os-

(1) Kitasato, *Ueber das Verhalten der Cholerabacterien zu anderen pathog. und nich pathog. Mikroorganismen*, Zeitschr. f. Hygiene. Vol. 6.°, 1889, p. 1. — *Das Verhalten der Cholerabacterien im menschlichen Koth*, Ibidem, Vol. 5.° 1888, pag. 487.

(2) Gruber, *Bacteriologische Untersuchungen von choleraverdächtigen Fällen*, ecc. Wiener med. Wochenschr. N.° 7 e 8, 1887.

(3) Lubarsch, *Zur Epidemiologie der asiatischen Cholera*, Deutsche med. Wochenschr. N. 43, 1892.

servazioni di Pfeiffer (1), non apparterrebbe ai prodotti del ricambio organico, ma sarebbe invece parte integrante del protoplasma batterico (proteine batteriche di Buchner).

La pretesa tossicità maggiore delle culture anaerobiche, ammessa da Hueppe, non è stata confermata nè da Gruber (2), nè da Pfeiffer, il quale ha trovato invece che il protoplasma batterico del vibrione colerigeno, cresciuto all'aria, è almeno cento volte più attivo delle culture anaerobiche di Hueppe. Secondo tali osservatori, gli effetti estremamente tossici delle culture anaerobiche del vibrione nelle uova (3) sarebbero in parte dovuti al solfato d'ammonio ed all'acido solfidrico che si trova negli estratti di tali culture, essendo però realmente anche le culture fatte nell'albume d'uovo fresco, in presenza dell'aria, fortemente virulente. Se havvi adunque aumento di virulenza, questo si deve al fatto della cultura nell'albume, e non all'anaerobicità, la quale del resto nell'interno delle uova è assai problematica.

Il vibrione colerigeno si mostra specialmente sensibile all'azione degli acidi, e difatti non vegeta bene se non nei mezzi a reazione debolmente alcalina: basta anzi un piccolo contenuto di acido, specialmente se minerale (0,07-0,08 %), nel mezzo nutritivo per impedirne lo sviluppo (4). È probabilmente un fatto consimile quello che spesso ci preserva dell'infezione, allorquando il germe del coléra, introdotto per le vie digerenti, incontra nello stomaco il succo gastrico acido, prima di arrivare nell'intestino, che è il suo luogo d'azione.

Abbastanza sensibile si mostra pure il vibrione di Koch verso l'azione della temperatura elevata, del disseccamento e dei disinfettanti chimici comuni.

Basta infatti la temperatura di 60° C. per ucciderlo in 10 minuti, mentre invece è molto resistente all'azione del freddo. Secondo le osservazioni di Uffelmann (5), sia nell'acqua come nel terreno, i vibrioni colerigeni tenuti fra — 4°,9 e — 15°,5 C. per 5 giorni e a — 24° C. per 4 giorni, non sono ancora completamente distrutti. Essi possono quindi conservarsi viventi lungamente anche nel ghiaccio e nella neve.

Il disseccamento invece li fa morire in un tempo diverso a seconda delle condizioni in cui si compie. Così, se si distende la cul-

(1) Pfeiffer, *Untersuchungen über das Choleragift,* Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 2.° 1892, pag. 393.

(2) Gruber, *Weitere Mittheilungen über vermeintliche und wirkliche Choleragifte,* Viener klinishe Wochenschrift, N.° 48 e 49, 1892.

(3) Scholl, *Untersuchungen über Choleratoxine*, Berl. klin. Wochenschr. 1890, pag. 933.

(4) Kitasato, *Ueber das Verhalten der Typhus-und Cholera-bacillen zu säure-und alcalihaltigen Nährböden*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 3.° 1888, pag. 404.

(5) Uffelmann, *Weitere Beiträge zur Biologie des Cholerabacillus. Einfluss der Kälte auf seine Lebensfähigkeit*, Berliner klin. Wochenschrift N.° 7, 1892.

tura in strato sottile sui vetrini coprogetti, dopo 2-3 ore i vibrioni sono tutti morti, mentre se si fa disseccare sui fili di seta, possono restare in vita persino 13 giorni (Kitasato). Uffelmann (1) ha osservato che i vibrioni colerigeni, disseccati sulle cartoline postali e sulla carta da scrivere, si mantengono viventi per 16-24 ore, mentre invece sulle monete di rame o d'argento, già dopo 10-30 minuti si trovano morti. Sulle nostre mani si trovano viventi dopo 1 ora, e spenti dopo 2 ore. Allo stato umido invece possono restare in vita anche alcuni mesi, e se la temperatura è favorevole (16-20°) anche moltiplicarsi.

Quanto all'azione dei disinfettanti chimici, l'acido fenico in soluzione di $^1/_2$ %, l'ac. cloridrico 1 %, il cloruro di calce 1 % e il sublimato $^1/_2$ per mille sono già sufficienti ad ucciderli in pochi minuti. Per la disinfezione delle feci diarroiche dei colerosi però il mezzo praticamente riconosciuto più efficace è il latte di calce al 20%, aggiunto alle feci press'a poco in parti eguali, oppure, secondo le prescrizioni di Pfuhl (2), in quantità tale, finchè il miscuglio abbia acquistato una reazione distintamente alcalina, lasciandolo a sè per 1 ora prima di versarlo nelle latrine (3).

Il vibrione di Koch, come questi ha dimostrato e come fu anche confermato dagli altri osservatori, dappertutto, si trova costantemente in tutti i casi di coléra asiatico, e non si trova mai invece nell'uomo sano, là dove il colèra non esiste, e neppure in altre malattie. Il reperto di una forma simile di vibrione, osservata da Finkler e Prior in un caso di *cholèra nostras*, è rimasto così isolato, che non gli si può davvero attribuire alcuna importanza. Oggidì è positivamente dimostrato che il così detto « colèra nostrano », lungi dall'essere eziologicamente un'unità morbosa, può invece essere dovuto a diversi microrganismi; cosicchè, senza volere escludere in modo assoluto che questa malattia possa talvolta esser dovuta anche al vibrione di Finkler e Prior, in ogni caso essa ha nulla a che fare col vero coléra.

Un fatto molto interessante, che si è potuto stabilire mediante l'osservazione batteriologica, estesa sistematicamente anche alle feci

(1) Uffelmann, *Beiträge zur Biologie des Cholerabacillus*, Berl. klin. Wochenschrift N.° 48, 1892.

(2) Pfuhl, *Ueber die Desinfection von Typhus-und Cholerabacillen in Fäcalmassen*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 6.°, 1889, pag. 97.

(3) Per preparare il latte di calce si prende 1 litro di calce viva, sminuzzata, e si mescola con 4 litri di acqua, versando dapprima nel recipiente, dove deve farsi la mescolanza, circa un litro di acqua e poscia la calce; appena questa ha assorbito l'acqua e si è ridotta in polvere, si aggiunge, agitando, il resto dell'acqua e si forma così il latte di calce. Allorquando non si adopera subito, bisogna conservarlo in un recipiente ermeticamente chiuso, ed agitarlo prima dell'uso.

delle persone, le quali, durante un'epidemia, convivono con quelle colpite dal male, si è la presenza dei vibrioni specifici nelle feci, appena diarroiche, di individui che godono ottima salute. Si è anche osservato il caso dello sviluppo subitaneo di un colèra grave in tali persone, sopravvenuto in seguito a qualche disturbo dietetico.

Questo fatto ci dimostra quanta influenza abbia la disposizione individuale pel prodursi dell'infezione, e ci dimostra pure che i vibrioni colerigeni non vengono uccisi tanto facilmente dal succo gastrico, ma possono invece passare nell'intestino e moltiplicarvisi, senza produrre fenomeni morbosi, finchè le condizioni del nostro organismo si mantengono normali. Quali sieno i momenti predisponenti per l'infezione, non lo si sa ancora; probabilmente hanno molta influenza le condizioni anatomiche dell'epitelio intestinale, e forse anche vi influiscono gli altri batterî che si trovano nell'intestino, per quanto parli contro di ciò il fatto, che spesso nell'intestino dei colerosi il vibrione colerigeno si trova in cultura pura, e che anzi i prodotti delle culture di questo microrganismo esercitano sugli altri un'azione deleteria (1).

Quanto alla localizzazione del vibrione nell'organismo ammalato, secondo le prime osservazioni di Koch confermate da un gran numero di altri osservatori, esso si trova esclusivamente nell'intestino tenue e nello spessore delle sue pareti, ma non nelle altre parti dell'organismo. Soltanto alcuni osservatori (Tizzoni e Cattani, Doyen, Nicati e Rietsch) avevano accennato alla presenza dei vibrioni anche nell'interno dell'organismo ammalato, e recentemente Rekowsky (2), adoperando per l'esame grossi pezzi dei visceri, ha potuto dimostrare molte volte, per quanto non costantemente, la presenza dei vibrioni specifici nella milza, nel fegato, nel sangue, nel liquido cefalo-rachidieno, nel rene e nella bile, anche facendo l'autopsia poco tempo dopo la morte.

Negli ammalati di colèra i vibrioni specifici mancano nel vomito, o vi si trovano soltanto in casi eccezionali, allorquando, cioè, in causa dei violenti moti antiperistaltici il contenuto dell'intestino si mescola a quello dello stomaco; essi trovansi, invece, più o meno abbondanti, talora quasi in cultura pura, nelle feci diarroiche, in proporzioni diverse però secondo i diversi periodi della malattia: si trovano infatti abbondanti nei primi stadî, specialmente nel periodo delle scariche alvine scolorate e risiformi, e diminuiscono in

(1) Gabritschewsky u. Maljutin, *Ueber die bacterienfeindlichen Eigenschaften des Cholerabacillus*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 13, 1893, pag. 780.

(2) Rekowsky, *Sur les microrganismes dans les organes des morts cholériques*, Archives des Sciences biologiques pubbliés par l'Institut impérial de méd. expérim. à St. Pétersbourg, T. I, 1892, pag. 517.

seguito, cedendo il posto agli ordinarî batterî dell'intestino. Nella maggior parte dei casi la presenza dei vibrioni nelle feci si può constatare fino al 9.°-10.° giorno di malattia, al minimo fino al 5.° giorno; non di rado però si trovano ancora al 12.°-14.°, e in casi eccezionali anche al 20.°-23.° giorno di malattia. Si è anche osservato il caso di trovare i vibrioni nelle feci di persone convalescenti, le quali hanno poscia sofferto gravi recidive.

Il constatare nelle feci diarroiche la presenza dei vibrioni colerigeni è l'unico mezzo col quale si può con certezza stabilire la diagnosi di coléra, quand'anche non si possa dire altrettanto pel caso opposto, giacchè possono talvolta le ricerche riuscir negative, o per insufficienza dei metodi adoperati, o per essersi fatta la ricerca in un periodo della malattia poco favorevole, e tuttavia trattarsi di vero coléra. Ad ogni modo è certo che la diagnosi di coléra asiatico non può essere fondata sui soli fenomeni clinici, perchè questi sono comuni a molte altre malattie, e ciò specialmente nell'inizio e nello spegnersi delle epidemie, allorquando, cioè, i casi sono isolati, e quando appunto riesce più importante lo stabilire con certezza la diagnosi del male, sia per poter prendere in tempo le precauzioni necessarie per arrestarne il decorso, e sia per non sopprimere troppo presto le opportune misure sanitarie.

Per fare questa diagnosi l'unico mezzo sicuro è quello adunque di dimostrare la presenza del vibrione di Koch nelle feci diarroiche sospette, e le ricerche a ciò destinate si compongono di tre momenti essenziali, e cioè: esame microscopico delle feci, isolamento del vibrione colerigeno mediante le culture, e differenziamento esatto di esso dalle altre specie consimili.

L'esame microscopico si fa col metodo comune dei preparati sui coproggetti, distendendo su questi in strati sottili i piccoli fiocchi di muco, che abbondano nelle feci diarroiche dei colerosi, e colorandoli, dopo averli fissati come d'ordinario, colla soluzione Ziehl di fucsina, diluita (1 a 4 d'acqua distillata) e riscaldata sulla fiamma, lasciandovela a contatto per 5 minuti, oppure colla soluzione Ehrlich di genziana, filtrata e riscaldata. Ricordiamo a questo proposito che i vibrioni colerigeni col metodo di Gram non si colorano.

In questi preparati i vibrioni colerigeni si trovano, più o meno abbondanti, come si è detto, secondo i casi, e secondo il periodo del male: essi si riconoscono, osservandoli con un obbiettivo a immersione, per la loro forma ricurva, o ad S, e talvolta anche per la loro disposizione a sciame, tutti disposti nella stessa direzione (Tav. VII, fig. 1); il che accade nell'atto del distendere sul vetrino i filamenti di muco, nel quale si trovano inclusi i vibrioni.

Allorqnando questi nei preparati si trovano abbondanti e colla disposizione caratteristica ora descritta, può un batteriologo esperto stabilire già la diagnosi col solo esame microscopico, ed ordinare le relative misure, non tralasciando però mai di confermarla col resto delle operazioni, che si andranno ora descrivendo.

L'isolamento dei vibrioni contenuti nelle feci, mediante le culture, si faceva in addietro col metodo classico di Koch, già descritto, delle tre diluzioni in gelatina di un fiocchetto di muco e della distensione di esse sulle lastre di vetro o nelle scatole di Petri. Oggidì questo metodo si è riconosciuto insufficiente per i casi nei quali i vibrioni nelle feci sono scarsi; cosicchè, anche perchè esso richiede un tempo piuttosto lungo per lo sviluppo delle colonie, si è ricorso ad altri mezzi più delicati, e in pari tempo più spicci.

E stato Schottelius (1) che ha avuto pel primo l'idea di semplificare e di render più breve un tal metodo di ricerca, mettendo a profitto la proprietà che ha il vibrione colerigeno di essere eminentemente aerobio, e di svilupparsi rigoglioso nel brodo diluito. Secondo le sue prescrizioni, si prende una quantità piuttosto grande di feci diarroiche (100-200 gr.), si mescolano con 250-500 cc. di brodo alcalino, diluito, in un bicchiere largo di vetro, e questo si tiene a 37° C. per 12-24 ore; in questo tempo i vibrioni colerigeni si sviluppano a preferenza degli altri batterì, e si raccolgono alla superficie del liquido sotto forma di pellicola, la quale, preparata ed osservata al microscopio col metodo già detto, si mostra composta da una cultura quasi pura di vibrioni. Da questa pellicola si fanno poscia culture isolanti nella gelatina e nell'agar, oppure si fa il trapianto in altro brodo per purificare la cultura sempre di più.

Questo metodo di Schottelius è stato ora modificato nel senso che, invece del brodo, si adopera una semplice soluzione di peptone, preparata come si è detto pel rosso colerico, e resa distintamente alcalina col carbonato di soda. Si mette in una serie di 8-10 tubi di soluzione di peptone qualche fiocco di muco, o qualche goccia delle feci sospette, e si tengono nel termostato a 37° C. A cominciare da poche ore dopo fatta la seminagione, appena il liquido comincia a intorbidarsi, si prende dalla superficie di questo un po' di materiale coll'ansa di platino e si esamina al microscopio; se le feci eran ricche di vibrioni specifici, questi si trovano quasi in cultura pura sulla superficie del liquido già dopo 6 ore, mentre

(1) Schottelius, *Zum mikroskopischen Nachweis von Cholerabacillen in Dejectionen,* Deutsche med. Wochenschr. 1885, N. 14, pag. 213.

se eran pochi, appaiono più tardi alla superficie, e commisti, più o meno, con altri batterî delle feci. Anche in questo caso però si ha il vantaggio di avere moltiplicati gli esemplari primitivi, cosicchè, facendo collo strato superficiale della soluzione di peptone culture isolanti nella gelatina o nell'agar, si riesce ad ottenere isolato il vibrione colerigeno, molto più facilmente che se si fosse adoperato fin da principio il materiale delle feci.

Secondo Koch, il tempo più propizio per fare l'esame delle culture in peptone sarebbe dalle 6 alle 12 ore dopo messe in termostato, facendo di quando in quando una prova per cogliere il momento di massimo sviluppo dei vibrioni colerigeni, oltrepassato il quale, prendono il sopravvento gli altri microrganismi. Per mio conto faccio osservare che il tempo necessario a che si abbia lo sviluppo dei vibrioni nella soluzione di peptone varia assai, non solo secondo l'alcalinità del liquido, ma anche secondo la qualità del peptone, e può persino protrarsi a 24 e più ore dopo fatto l'innesto. E quindi buon precetto, prima di accingersi a simili ricerche, di provare il grado migliore di alcalinità e il tempo più propizio per l'esame del peptone che si possiede.

In ogni caso non si deve mai trascurare di completare l'esame colle culture isolanti, fatte nella gelatina collo strato superficiale della cultura in peptone, secondo il metodo classico più volte ricordato. Non bisogna dimenticare che a tale scopo occorre adoperare una gelatina al 10 %, avente un grado di alcalinità speciale, il quale, secondo le ricerche di Dahmen (1) e di Stutzer Burri (2), deve essere di 0,5 a 1 % di carbonato sodico cristallizzato, e che bisogna finalmente tenere le colture a 22° C., perchè si abbiano dopo 24 ore sviluppate le colonie col loro aspetto caratteristico.

Oltre a ciò, secondo Deycke (3), la ricerca e l'isolamento del vibrione colerigeno dalle miscele di altri microrganismi verrebbe agevolato di molto coll'uso di una gelatina speciale, preparata col 2-3 % di albuminato alcalino; giacchè in questa gelatina il vibrione colerigeno si svilupperebbe a preferenza e molto più rapidamente degli altri microrganismi, coi quali si può trovare commisto nelle feci, compreso il *B. coli*.

La maniera di preparare una tale gelatina è la seguente:

Si prende 1 Kgr. di carne di vitello magra, finamente sminuzzata, e si mescola con 1200 cc. di soluzione di potassa caustica al 3 %, lasciandola digerire per

(1) Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. XII, 1892, pag. 620.
(2) Zeitschrift f. Hygiene, Vol. XIV, 1893, pag. 9.
(3) Deycke, *Ueber einen neuen elektiven Nährboden für Cholerabacillen*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 37, 1893.

due giorni a 37° C. e tenendola poscia a 60-70° per qualche ora, finchè si sieno disciolte tutte le sostanze albuminoidi della carne. Questa soluzione bruna si filtra, e dal filtrato chiaro si fanno precipitare gli albuminati, aggiungendovi, a poco a poco, acido cloridrico puro, e raccogliendo poscia il precipitato in un filtro di panno. Questo precipitato si stempera in un mortaio nell'acqua distillata e si fa sciogliere, aggiungendovi una soluzione satura di carbonato sodico fino a reazione distintamente alcalina, e facendolo cuocere per qualche ora nella corrente di vapor d'acqua. Fatto ciò, si corregge di nuovo la reazione del liquido con un acido (lattico o cloridrico) molto diluito, fino a renderla debolmente alcalina, quasi neutra, si fa evaporare a bagno maria, si dissecca, e si ottiene così una polvere fine, grigiastra di albuminato alcalino.

Si fa una soluzione di quest'albuminato al 2 1/2 %, vi si aggiunge 1 % di peptone, 1 % di cloruro sodico e 10 % di gelatina, e si alcalinizza colla soda a 1 %.

Però, come complemento delle culture in peptone, vale forse meglio adoperare l'agar, facendo con questa le culture isolanti, per potere avere più presto sviluppate le colonie e stabilire così più rapidamente la diagnosi, giacchè dopo 10 ore di permanenza a 37° C. le colonie sono già sviluppate a sufficienza per potere essere esaminate al microscopio. Le colonie superficiali del vibrione colerigeno nell'agar hanno un aspetto grigio-brunastro, trasparente, abbastanza caratteristico per un occhio pratico; bisogna però sempre aiutarsi coll'esame microscopico, non essendo il loro l'aspetto così caratteristico come quello delle colonie sviluppate nella gelatina.

Per fare le colture nell'agar, bisogna prima versare questa sostanza nelle scatole di Petri, lasciarla qualche giorno nel termostato perchè evapori il liquido che si spreme fuori da essa nell'atto della sua solidificazione, e distendere poscia coll'ansa di platino il materiale preso dalla cultura in peptone sulla superficie di 3-4 scatole di agar successivamente, per ottenere isolati i germi che vi sono contenuti.

V'è chi consiglia invece (1) di fare sin dapprincipio colle feci le culture isolanti nell'agar, come si fanno nella gelatina, esaminando le colonie che si sviluppano nello spessore dell'agar dopo poche ore di permanenza a 37° C.

Riguardo all'isolamento del vibrione colerigeno dalle feci, merita ancora di essere ricordato il metodo che suggerisce Schill (2), il quale, fondandosi sull'azione deleteria, già ricordata, che esercitano i prodotti del ricambio materiale del vibrione di Koch sugli altri microrganismi, propone di adoperare in luogo della soluzione

(1) Schiller, *Zur Diagnose der Cholerabacillen mittels Agarplatten*, Deutsche med. Wochenschr. 1893, pag. 639.

(2) Schill, *Zum raschen Nachweis der Cholerabacillen in Wasser und Faeces*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. XIV, 1893, pag. 750.

di peptone una cultura in brodo di detto vibrione, vecchia di qualche settimana, sterilizzata coll'ebollizione ed alcalinizzata, procedendo poscia al resto delle operazioni (culture isolanti nella gelatina o nell'agar) come pel metodo sopra descritto.

Comunque siasi effettuato lo isolamento, resta ancora l'ultima parte, che è forse la più difficile, ed è di accertarsi che i vibrioni coltivati sono realmente quelli del colèra.

Questa diagnosi, come si è detto, si fonda specialmente, secondo la scuola di Koch, oltre che sui caratteri morfologici e di cultura, sulla reazione dell'indolo e sulla constatazione dell'azione patogena per gli animali. Quanto al primo punto si è già detto come si deve operare, e quale è la nostra opinione circa al valore di tal segno. Le esperienze negli animali sono dirette a constatare l'azione mortale, tossica, che esercitano, secondo Koch, i vibrioni colerigeni iniettati nel peritoneo delle cavie. Giusta le sue prescrizioni, si prende dalla superficie di una cultura in agar una grossa ansa di platino di materiale (circa 1,5 mmgr.), si stempera in 1 cc. di brodo sterilizzato e si inietta nella cavità peritoneale di una cavia di 300-350 gr. di peso. Se si tratta di vero colèra, si vedono sopravvenire poco dopo l'iniezione, i fenomeni caratteristici dell'intossicazione coleriforme: grande prostrazione, crampi muscolari ed un rapido ed enorme abbassamento della temperatura, che termina colla morte dell'animale, dopo poche ore (in 2-6-16 ore, generalmente).

Per quel che riguarda l'esperimento negli animali, non possiamo assolutamente convenire con Koch, nè sulla esclusività di tale azione patogena, che egli attribuisce al solo vibrione colerigeno, nè sul fatto che l'azione patogena del vibrione, iniettato nelle cavie nella maniera anzidetta, si limiti ad una semplice intossicazione.

Oltre al vibrione studiato da Gamaleia, la cui cultura uccide le cavie nella stessa quantità e cogli stessi fenomeni che quello colerigeno, ed oltre a quello di Deneke, che spiega sulla cavia un'azione analoga, noti già da qualche tempo, gli studî recenti hanno messo in evidenza una serie molto numerosa di vibrioni « colèra-simili » (quasi altrettanto numerosa di quella dei « tifo-simili »), i quali sono stati trovati sia nell'acqua e sia nelle feci dell'uomo, e cioè precisamente in quei materiali, dove è di maggior momento accertare la presenza dei veri vibrioni del colèra (1).

(1) Per meglio persuadere il lettore, diamo qui un elenco dei lavori pubblicati finora su tale argomento: Günther, *Ueber eine neue, im Wasser gefundene Kommabacillenart*, Deutsche med. Wochenschr. 1892, N. 49. — Fokker, *Ueber einen dem Cholerabacillus ähnlichen Pilz*, Deutsche med. Wochenschr. 1893, N. 7. — Weibel, *Ueber eine neue im Brunnenwasser gefundene Vibrionenart*, Centralblatt

Orbene, di tali vibrioni simili a quello del colera, alcuni si distinguono da questo per certi caratteri, ed altri invece gli rassomigliano tanto, anche per l'azione patogena sugli animali, che riesce molto difficile distinguerli dai veri colerigeni; cosicchè, fino a tanto che non si trovi un qualche mezzo, oltre quelli sopra enunciati, che serva a distinguerli nettamente e in maniera sicura, non conoscendo ancora il rapporto che passa fra i colèra-simili e quelli veri (sono varietà di una stessa specie, o specie diverse?), dobbiamo dire che realmente in certi casi può anche ai batteriologi provetti riuscir difficile stabilire con certezza la diagnosi di bacillo del colèra, e che nei casi dubbi il meglio si è di ricorrere al confronto con una cultura di vibrioni coltivati dal contenuto intestinale dei malati in tempi di epidemia, osservando diligentemente tutte quante le proprietà biologiche conosciute dei due microrganismi che si paragonano fra di loro, senza dare però un peso speciale e prevalente all'una piuttosto che all'altra proprietà.

In quanto all'*azione patogena* del vibrione colerigeno, giacchè se ne è parlato poco sopra, cominciamo appunto a parlare dell'iniezione peritoneale.

Si è già detto che non si può ammettere che in tal caso si tratti di una semplice azione tossica, giacchè le esperienze di Gruber e Wiener, di Sobernheim (1), ed anche le mie personali hanno concordamente dimostrato che nell' organismo della cavia inoculata nel peritoneo ha luogo un'abbondante moltiplicazione dei vibrioni introdotti, e che ai veleni da essi prodotti, oltrechè a quelli introdotti colla cultura, si deve l'azione patogena e mortale dell'innesto peritoneale.

All'autopsia si trova infatti il peritoneo viscerale e parietale,

f. Bacteriologie, Vol. 13, 1893, pag. 117. — Bujwid, *Ueber zwei neue Arten von Spirillen im Wasser*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 13, 1893, pag. 120. — Löffler, *Zum Nachweis der Cholerabacterien im Wasser*, Centralblatt f. Bacteriologie, Vol. 13, 1893, pag. 381. — Kiessling, *Ein dem Choleravibrio ähnlicher Kommabacillus*, Arbeiten a. d. kais. Gesundheitsamte, 1893, Vol. 8, N. 3, pag. 430. — Finkelnstein, *Dem Kommabacillus ähnliche Bacterien im Flusswasser*, Wratsch 1893, N. 22, pag. 629. — Fischer, *Ueber einige bemerkenswerthe Befunde bei der Untersuchung choleraverdächtigen Materials*, Deutsche med. Wochenschr. 1893, N. 23 e 24. — Bleisch, *Beitrag zur bacteriologischen Differenzialdiagnose der Cholera*, Zeitschrift f. Hygiene Vol. 13, 1893, pag. 31. — Rubner, *Vibrio Berolinensis*, Hygienische Rundschau 1893, N. 16. — Heider, *Vibrio Danubicus*, Centralblatt. f. Bacteriologie, Vol. 14, 1893, N. 11, pag. 341. — Dunbar, *Untersuchungen über Choleraähnliche Wasserbacterien*, Deutsche med. Wochenschr. 1893, N. 33. — Vogler, *Ueber einen neuen im diarroischen Stuhl gefundenen Vibrio*, Deutsche med. Wochenschr. 1893, N. 35. — Sanarelli, *Les vibrions des eaux et l'étiologie du choléra*, Annales de l'Institut Pasteur, T. VII, 1893, pag. 693.

(1) Sobernheim, *Experimentelle Untersuchungen über Choleragift und Choleraschutz*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 14, 1893, pag. 485.

e specialmente quello diaframmatico, fortemente congesto, e i vibrioni colerigeni si trovano abbondanti nell'essudato peritoneale, nel sangue ed anche nell'intestino, dove anzi talvolta si trovano in grande quantità. Qualche volta si sviluppa edema attorno al punto dove si è fatta l'iniezione, ed allora si trovano i vibrioni anche nel liquido dell'edema (1).

Naturalmente il quadro morboso varia a seconda del grado di virulenza dei vibrioni inoculati, il quale può essere molto diverso, secondo la loro origine; ma per ottenere la morte degli animali con vibrioni poco attivi, oppure colle culture sterilizzate di vibrioni molto virulenti, è necessario iniettare nel peritoneo una quantità di materiale molto maggiore, ed in tal caso l'esito letale è dovuto semplicemente all'azione dei veleni preformati introdotti.

Un'avvertenza importante, a cui badare nell'eseguire una tale esperienza, è quella di usare culture in agar giovani (di 20-24 ore), giacchè il vibrione colerigeno nelle culture si attenua rapidamente. Basta però « ringiovanire » la cultura, ossia farla sviluppare nell'agara 37° C., perchè il vibrione riacquisti la primitiva virulenza.

Anche l'innesto sottocutaneo delle culture, quando i vibrioni sono molto virulenti, può servire ad uccidere le cavie, od anche i conigli.

Ma l'esperimento classico per la prova dell'azione patogena del vibrione colerigeno è quello dell'introduzione di esso nello stomaco e nell'intestino, tentato la prima volta con successo nelle cavie da Nicati e Rietsch (2), i quali riuscirono nell'intento mediante l'introduzione diretta delle culture nel duodeno, previa legatura del condotto coledoco, dimostrando in tal guisa che, per riuscire a riprodurre sperimentalmente l'infezione, sono necessarie principalmente due condizioni: che i vibrioni sfuggano all'azione deleteria del succo gastrico acido, e che sia favorita la loro permanenza nell'intestino mediante la diminuzione dei movimenti peristaltici (esclusione della bile).

Koch ha riprodotto queste due condizioni in altra maniera: introducendo, cioè, colla sonda nello stomaco delle cavie le culture di coléra (10 cc. di cultura nel brodo), previa neutralizzazione del contenuto stomacale col carbonato di soda (5 cc. di soluzione al 5%) e paralizzazione dei movimenti intestinali colla morfina (0,75 gr. di tintura d'oppio per ogni 200 gr. di peso dell'animale, iniettata nel peritoneo).

(1) Secondo le osservazioni di Klein (Centrabl. f. Bacter. Vol. XIII, N.° 13, e di Sobernheim (Hygienische Rundschau, 1893. N.° 22), l'iniezione intraperitoneale di molti altri batterî produce nelle cavie gli stessi sintomi e le stesse alterazioni patologiche che il vibrione del colèra.

(2) Nicati et Rietsch, *Récherches sur le choléra*, Revue de médecine, N.° 6, 1885.

Le cavie muoiono con fenomeni di abbassamento forte della temperatura e di debolezza progressiva, 1-2 giorni dopo l'innesto; talvolta poco prima della morte si manifestano paralisi delle estremità posteriori e crampi muscolari, senza però che si abbia mai nè vomito, nè diarrea. Alla necroscopia si trova, come nell'uomo morto nel periodo acuto del male, l'intestino tenue fortemente congesto e ripieno di un liquido tenue, torbido e grigio-rossastro, nel quale si trovano i vibrioni in grandissima quantità.

Le cavie inoculate in tal guisa non muoiono tutte, ma soltanto in proporzione di 80-90 %; e le culture sterilizzate, introdotte per questa via, sono capaci di uccidere le cavie nella stessa quantità di quelle viventi.

Le esperienze sulla riproduzione della malattia per mezzo delle culture del vibrione di Koch non si sono limitate agli animali, ma sono state fatte anche nell'uomo, con risultato positivo, parte involontariamente, per mera accidentalità, e parte invece in grazia dell'abnegazione e dell'amore alla scienza di alcuni egregi sperimentatori.

Fra i casi della prima categoria, all'esempio, già citato, del medico che frequentava il « corso del coléra » nel laboratorio di Koch, possiamo aggiungerne un altro di un inserviente del laboratorio batteriologico di Danzica, il quale, dopo aver ripulito oggetti di vetro contenenti colture fresche di vibrione colerigeno, fece colazione senza lavarsi le mani, ed ammalò di colera due giorni dopo (1).

Fra coloro, i quali vollero su sè stessi sperimentare l'azione del temuto vibrione, citiamo principalmente Pettenkofer ed Emmerich (2), i quali ingoiarono rispettivamente 1 cc. e 0,1 cc. di cultura in brodo assai ricca di vibrioni, diluita in 100 cc. di soluzione di carbonato sodico 1 %, ed ebbero ambedue, a partire dal 3.° giorno dopo l'ingestione, scariche diarroiche contenenti in grandissimo numero i vibrioni specifici, a cui si aggiunsero, nel secondo, voce roca, senso di secchezza alle fauci e sete ardente.

Questo caso ha dato origine, per la sua interpretazione, a polemiche vivaci; ma tuttavia, malgrado l'opinione contraria di Pettenkofer, non v'ha ormai dubbio che sia stato, strano a dirsi, il più grande oppositore di Koch, quegli che ha dato la prova spe-

(1) Freymuth u. Lickfett, *Laboratoriumscholera, beobactet und mit dem modificirten Lickfett'schen Verfahren in sechs Stunden bacteriologisch diagnosticirt*, Deutsche med. Wochenschr. 1893, N.° 19, pag. 456.

(2) Pettenkofer, *Ueber Cholera mit Berücksichtigung der jüngsten Choleraepidemie in Hamburg*, Münchener med. Wochenschr. 1892, N.° 90.

rimentale più bella della specificità del vibrione colerigeno per la malattia, giacchè non v'ha dubbio che casi leggeri di malattia, quali sono quelli di Pettenkofer e di Emmerich (quello di quest' ultimo non tanto leggero) si verificano numerosi in tutte le epidemie di colèra.

Anche altri, e fra questi specialmente Metschnikoff (1), han fatto esperienze numerose coll'ingestione della cultura del vibrione colerigeno, sia su sè stesso, ma senza successo, e sia sul personale del laboratorio, con esito diverso, ma quasi sempre positivo. Fra le esperienze fatte da Metschnikoff sull'uomo merita specialmente di esserne ricordata una, nella quale l'ingestione dei vibrioni fu seguita da un colèra tipico, con vomito, diarrea risiforme, ipotermia, crampi alle sure ed anuria.

Per terminare quanto riguarda la biologia di questo microrganismo, resta ancora a dire qualche cosa sull'immunità che si può conferire agli animali contro l'azione patogena di esso, e sui tentativi di immunizzazione e di cura fatti anche nell'uomo.

L'immunità delle cavie contro l'infezione da vibrione colerigeno si può ottenere facilmente, o mediante l'innesto preventivo delle culture poco virulente (Löventhal), o mediante l'introduzione di una piccola dose, non mortale, di materiale virulento (Wassermann), o finalmente mediante le colture sterilizzate colla filtrazione, come ha fatto Vincenzi (2), il quale ha pure provato che il siero sanguigno degli animali resi immuni possiede anch'esso proprietà immunizzanti. È importante il fatto, che tanto le culture viventi, come quelle sterilizzate servono egualmente per conferire l'immunità, e che questa si ottiene negli animali in un tempo molto breve, e dura qualche settimana ed anche qualche mese. Sembra però che le culture viventi abbiano, a egual dose, un potere immunizzante maggiore di quelle filtrate, il che tenderebbe a dimostrare che la sostanza attiva sia contenuta nella cellula batterica.

Gli animali resi immuni contro l'infezione colerica non divengono più resistenti all'azione dei veleni specifici. Non si tratta quindi di una maggior resistenza all'azione dei veleni, ma piuttosto di un aumento del potere battericida dell'organismo.

Anche il siero di sangue delle persone guarite dal colèra possiede, come quello degli animali resi immuni artificialmente, la proprietà di conferire l'immunità contro l'infezione sperimentale (3);

(1) Metschnikoff, *Recherches sur le choléra et les vibrions*, Annales de l'Institut Pasteur, T. VII, 1893, pag. 562.

(2) Deutsche med. Wochenschr., 5 Mai 1892.

(3) Lazarus, *Ueber antitoxische Wirksamkeit des Blutserums Cholera-Geheilter*, Berliner klin. Wochenschr. N.° 43 e 44, 1892.

nè l'uno nè l'altro, però ha mostrato finora un'azione curativa sicura sull'infezione sperimentale già in corso. Soltanto Pawlowsky (1) afferma di avere avuto risultati positivi col siero di sangue di cane, reso immune ad un grado molto elevato.

Negli animali l'innesto preventivo, peritoneale, sottocutaneo, o intravenoso, secondo le esperienze fatte finora, produce l'immunità più facilmente e più sicuramente che l'introduzione del materiale immunizzante per la via degli organi digerenti; per quanto Klemperer (2) sia riuscito a rendere le cavie refrattarie anche per quest'ultima via.

Nell'uomo invece, secondo le osservazioni di Metschnikoff (3) e di Hasterlik (4), pare succeda il contrario; ossia l'ingestione di culture attenuate preserverebbe dall'azione di quelle virulente, introdotte per la stessa via, mentre le iniezioni sottocutanee dello stesso materiale, proposte la prima volta da Ferran e patrocinate poscia da Haffkine, non servirebbero a preservare dall'azione dei vibrioni introdotti negli organi digerenti.

L'innesto preventivo adunque, se dà buoni risultati negli animali, non ha finora dato nell'uomo risultati incoraggianti. Dalle esperienze fatte sull'uomo si può dedurre con certezza solamente il fatto, che i vibrioni colerigeni, pure essendo indiscutibilmente la causa del coléra, possono essere ingeriti dall'uomo sano e normale anche in grande quantità, senza produrre la malattia; il che vuol dire che l'osservazione epidemiologica, che aveva rilevato la grande influenza della predisposizione individuale sullo svolgersi della malattia, ha trovato la sua conferma nell'esperimento, senza che questo però ci abbia illuminato sulle cause di quella.

In quanto alla via d'ingresso, che tiene il parassita per produrre l'infezione nel nostro organismo, e alla maniera sua di diffondersi nel produrre le epidemie, senza addentrarci troppo a discutere le due teorie opposte che si sono contese il campo in questa questione, la teoria « localistica » di Pettenkofer e quella « contagionistica » di Koch, diremo che ormai, non solo i fatti d'ordine batteriologico, ma anche quelli d'ordine epidemiologico hanno dimostrato che il virus colerigeno si propaga per mezzo dell'uomo ammalato, per contagio diretto o indiretto, come sostiene Koch, anzichè per miasma dopo essersi rinforzato nel terreno, dove troverebbe

(1) Pawlowsky u. Buchstab, *Zur Immunitätsfrage und Blutserumtherapie gegen Cholerainfection*, Deutsche med. Woch., N.° 22-27, 1893.

(2) Klemperer, *Untersuchungen über künstlichen Impfschutz gegen Choleraintoxication*, Berliner klin. Wochenschr. N.° 32, 1892.

(3) Lavoro ultimo citato.

(4) Wiener klinische Wochenschrift, 1893, pag. 167.

disposizioni favorevoli di luogo e di tempo, come vorrebbe Pettenkofer.

Il contagio diretto può avvenire pel fatto che, se le persone che avvicinano gli infermi, dopo aver toccato le biancherie od altri oggetti inquinati colle feci dei colerosi, si toccano la bocca o toccano i cibi che mangiano, senza usar prima le necessarie precauzioni di pulizia e di disinfezione delle mani, possono con tutta facilità introdurre nella bocca il materiale infettante: il contagio indiretto si opera per ciò, che il vibrione colerigeno, emesso colle feci, arriva nel nostro organismo per mezzo delle acque, degli alimenti e fors'anco per mezzo dell'aria, giacchè secondo i risultati di alcune osservazioni (Hesse (1), Uffelmann (2)) il vibrione del colèra, mescolato con diversi materiali solidi (terra di giardino, sabbia e spazzatura) e lasciato disseccare all'aria, si trova vivente anche qualche ora (fino 24 ore) dopo che si è operato il disseccamento completo del materiale. Non può dirsi quindi esclusa la possibilità, che il germe del colèra possa essere sollevato nell'aria colla polvere, e con essa arrivare sulle sostanze alimentari, o direttamente nella bocca, penetrando così nel canale digerente, dove, se trova condizioni favorevoli pel suo svilupppo (acidità scarsa del contenuto stomacale, inerzia intestinale, infiammazione, ecc.), si moltiplica e produce sostanze velenose, le quali diffondendosi nell'organismo dànno origine ai fenomeni morbosi caratteristici dell'infezione.

Hueppe (3) ha creduto potere conciliare le due teorie opposte, sopra accennate, ammettendo che il coléra è una malattia miasmatico-contagiosa, e che il suo sviluppo trovasi realmente in dipendenza di condizioni esterne, dimostrabili anche coi fatti d'ordine batteriologico. Egli infatti ritiene che il vibrione colerigeno sviluppandosi anaerobicamente nell'intestino divenga molto meno resistente alle influenze esterne nocive, e che, sviluppandosi invece al difuori, a contatto dell'aria, si faccia più resistente, in modo da potere escir vittorioso nella lotta col succo acido dello stomaco e produrre l'infezione. Secondo Hueppe adunque il colèra sarebbe contagioso soltanto in rari casi, e per lo più invece miasmatico, nel senso che il vibrione colerigeno dovrebbe prima svilupparsi aerobicamente nel terreno, per potere acquistare una resistenza maggiore e produrre così l'infezione.

Questa teoria di Hueppe però, per quanto ingegnosa, è basata finora su dati ipotetici, ed anzi contradetti sperimentalmente da altri osservatori. Ed invero, tanto il fatto dell'esistenza di una forma più resistente nel vibrione sviluppato a

(1) Hesse, *Ueber Aetiologie der Cholera*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 14, Heft. 1, 1893.

(2) Uffelmann, *Können lebende Cholerabacillen mit dem Boden und Kerichtstaub durch die Luft verschleppt werden?* Berl. klin. Wochenscrift, 1893, N.° 26, pag. 617.

(3) Hueppe, *Zur Aetiologie der Cholera asiatica*, Berl, klin. Wochenschrift, 1890, pag. 189.

contatto dell'aria, come quello della virulenza maggiore che esso acquisterebbe coltivato anaerobicamente, sono stati dimostrati erronei ambedue; e, quasi ciò non bastasse, si è anche dimostrato (De-Giaxa (1)) che il vibrione colerigeno nel terreno, anzichè svilupparsi, presto scompare, sopraffatto nella lotta dagli altri microrganismi, qualunque sia la composizione e la natura di quello.

19. Vibrioni di Metschnikoff, di Deneke e di Finkler e Prior.

Questi tre vibrioni meritano di essere ricordati, perchè simili assai, non soltanto per la forma, ma anche per le proprietà biologiche, al vibrione colerigeno, col quale formano, direi quasi, una sola famiglia.

Il « vibrione di Metschnikoff » è il più interessante dei tre, sia perchè meglio studiato nelle sue proprietà, e sia perchè è quello che più si avvicina al vibrione di Koch. È stato scoperto da Gamaleia (2) nel contenuto intestinale dei polli affetti da una malattia comune in Russia nella stagione estiva, e che decorre con sintomi clinici analoghi a quelli del così detto « coléra dei polli », dal quale però si distingue specialmente per la mancanza dell'ingrossamento della milza, e per le condizioni dell'intestino simili a quelle del coléra dell'uomo.

Questo vibrione è un poco più corto, più grosso, e più ricurvo di quello del coléra; è mobile e provvisto di un solo filamento ciliare, situato ad una delle estremità. Le particolarità sue di sviluppo nella gelatina, nell'agar e sulle patate sono pressochè eguali a quelle del vibrione colerigeno. La cultura nella soluzione di peptone fornisce egualmente la reazione dell'indolo cogli acidi minerali puri, privi di acido nitroso.

Secondo Pfeiffer (3) si distinguerebbe dal vibrione di Koch per ciò che, inoculato per via sottocutanea nei colombi e nelle cavie, uccide questi animali coi fenomeni di setticemia, con edema sanguinolento nel luogo d'innesto e con enorme quantità di vibrioni nel sangue e in tutti gli organi interni, mentre l'intestino si trova pressochè normale e contenente rari esemplari del microrganismo. Nelle cavie riesce patogeno, anche se introdotto nello stomaco col metodo di Koch, come il vibrione colerigeno.

Questo vibrione è interessante anche per ciò, che esso offre uno dei più belli esempî di immunità artificiale, ottenuta per mezzo dei prodotti dello scambio materiale del microrganismo. Gamaleia ha dimostrato che i colombi e le cavie, per quanto sieno molto sensibili all'azione di esso, si possono rendere sicuramente refrattarî, mediante l'iniezione delle culture sterilizzate a 100° C.

Si decolora anch'esso col metodo di Gram, e si colora assai facilmente colle soluzioni acquose semplici dei colori d'anilina.

Il « vibrione di Deneke » (4) è stato da questi trovato nel formaggio vecchio, ed è simile per forma e per maniera di colorazione a quello del colèra. Esso fluidifica però la gelatina più rapidamente (Tav. IV, fig. 3), e la colonia assume un colorito giallognolo. È anch'esso patogeno per le cavie, se introdotto nello sto-

(1) De-Giaxa, *Le bacille du cholera dans le sol*, Annales de Micrographie N.° 5, 1890.

(2) Gamaleia, *Vibrio Metschnikoff et ses rapports avec les microbes du choléra asiatique*, Annales de l'Institut Pasteur, N.° 9-10, 1888.

(3) Pfeiffer, *Ueber den Vibrio Metschnikoff und sein Verhältniss zur Cholera asiatica*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. 8.° 1889, pag. 347.

(4) Deneke, *Ueber eine neue, den Choleruspirillen ähnliche Spaltpilzart*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 5, 1885.

maco col metodo di Koch, oppure anche nel peritoneo, ma è meno patogeno che il vibrione colerigeno. È anche patogeno pel colombo, come il vibrione di Metschnikoff, dal quale si distinguerebbe per ciò che nella soluzione di peptone non dà la reazione dell'indolo (1). Ingerito in grandi dosi è anche capace di produrre disturbi intestinali nell'uomo (Metschnikoff); sicchè non è improbabile che esso entri, per qualche cosa, nelle intossicazioni coleriformi che può produrre il formaggio, tanto più che è anche stato trovato una volta in un formaggio tossico a Livorno (2).

Quanto al vibrione di Finkler e Prior (3), è quello di cui più si è parlato, perchè l'averlo trovato nel contenuto intestinale di un caso di coléra nostrano fece credere dapprincipio che esso fosse identico al vibrione del coléra asiatico, il quale avrebbe perduto per ciò del suo carattere veramente specifico per questa malattia. In seguito però ben presto si riconobbe che il microrganismo coltivato da Finkler e Prior è molto più diverso dal vibrione di Koch che non gli altri due sopra accennati, e che, oltre a ciò, lungi dal trovarsi costantemente nel colèra nostrano, non è più stato trovato da alcuno in casi di malattia consimile, ma soltanto accidentalmente una volta nell'intestino di un individuo normale (suicida).

Oggidì adunque un tale microrganismo non ha più assolutamente alcuna importanza, e lo ricordiamo soltanto perchè simile a quello colerigeno, per la forma e per alcune sue proprietà di sviluppo, analogamente a quanto si è detto pel vibrione di Metschnikoff e per quello di Deneke.

Il vibrione di Finkler e Prior sembra essere uguale a quello isolato da Miller dal contenuto dei denti cariati.

Rinunciamo a dare la descrizione biologica degli altri numerosi « colera-simili » recentemente trovati, perchè dovremmo ripetere, su per gid, le stesse cose già dette a proposito dei tre precedenti.

20. Spirillo della febbre ricorrente.

Questo spirillo, comunemente detto *spirochete* di Obermeyer, il quale ne fu lo scopritore, è l'agente patogeno di una malattia contagiosa, caratterizzata da accessi febbrili intermittenti, comune specialmente nell'Europa del Nord, e che va col nome di *tifo* o *febbre ricorrente*. Ciò si è provato non solo col dimostrare la presenza costante ed esclusiva di questi spirilli nel sangue delle persone colpite da tale malattia, ma anche colla riproduzione dell'infezione, ottenuta mediante l' innesto del sangue contenente gli spirilli nell'uomo e nella scimmia.

Questi spirilli sono piuttosto lunghi, e simili a quelli del colèra, ma più delicati e sottili (Tav. VII, fig. 10). Sono mobilissimi, e si trovano nel sangue soltanto durante l'accesso febbrile, e non durante l'apiressia ; in questo periodo si trovano invece accumulati nella milza, dove, come ha dimostrato Metschnikoff, sono per la maggior parte inclusi entro elementi cellulari (fagociti).

(1) Secondo Günther però anche nelle culture del vibrione di Deneke (culture vecchie) si otterrebbe la reazione del rosso colerico.
(2) Bollettino chimico farmaceutico, 15 ott. 1892.
(3) Finkler und Prior, *Forschungen über Cholerabakterien*, Bonn, 1885.

Non si trovano nell'orina, nè nella saliva, nè nel sudore. Non si è neppure riuscito a coltivarli al difuori dell'organismo, e non si sa quindi nulla delle loro proprietà biologiche, nè della maniera colla quale l'infezione si produce nell'uomo e si diffonde.

Si colorano bene nei preparati di sangue, specialmente colla fucsina, e non si colorano col metodo di Gram.

Nei tessuti la colorazione degli spirilli riesce difficile e poco evidente. Soudakewitch (1) raccomanda il metodo seguente: le sezioni, colorate dapprima nel carmino borico, si decolorano nel liquido di Orth (70 di alcool, 30 di acqua e 1 di ac. cloridrico), si lavano con acqua e si tengono poscia per 12-24 ore in una soluzione fenica di azzurro di metilene, molto allungata: si immergono in seguito per un secondo nell'alcool a 95°, colorato coll'azzurro di metilene, si passano nell'olio d'anilina, colorato egualmente, e poscia in quello incoloro, si rischiarano coll'olio di cedro e si chiudono in balsamo. Si ottiene così una colorazione doppia, bene distinta; anzi il colore degli spirilli è più intenso nelle sezioni precedentemente colorate col carmino.

21. Diplococco della polmonite crupale.

Questo microrganismo, designato coi varî nomi di « diplococco di Fränkel », « Diplococcus pneumoniae » (Weichselbaum), « meningococco » (Foà e Bordoni-Uffreduzzi), « micrococco della setticemia salivare » (Pasteur), o *diplococco lanceolato capsulato,* come è meglio chiamarlo secondo le sue principali proprietà di forma, è stato per opera anzitutto degli studî di Fränkel (2), e poscia per quelli di Weichselbaum (3), riconosciuto come il vero agente specifico della *polmonite crupale, genuina* e *primitiva.*

Diciamo così perchè il processo infiammatorio del polmone, la polmonite, come non è unico nelle sue manifestazioni anatomo-patologiche, così non è unico nella sua eziologia; e perciò, come si può oggidì con certezza affermare che il diplococco di Fränkel è l'agente specifico della polmonite crupale genuina, così le altre forme di polmonite (polmoniti secondarie, ecc.) possono essere causate, oltrechè da quel microrganismo, anche da altri, quali il bacillo di Friedländer, il bacillo del tifo, lo streptococco e gli stafilococchi piogeni. La specificità del diplococco di Fränkel è ormai provata indubbiamente dalla presenza costante di

(1) Soudakewitch, *Recherches sur la fièvre récurrente,* Annales de l'Institut Pasteur, Vol. 5.° 1891, pag. 545.

(2) A. Fränkel, *Bakteriologische Mittheilungen,* Deutsche med. Wochenschr. N.° 31, 1885. — Zeitschr. f. klinische Medicin, 1886, Vol. 10.°, Heft. 5-6, Vol. 11.°, Heft 5-6.

(3) Weichselbaum, *Ueber die Aetiologie der acuten Lungen-und Rippenfellentzündungen,* Wiener med. Jahrbücher, 1886, pag. 483.

esso in tutti i casi della malattia, dal trovarsi in maggiore abbondanza là dove l'infiammazione polmonare è più recente, e specialmente nelle parti edematose, circostanti ai punti epatizzati, e finalmente dal potersi con esso riprodurre sperimentalmente la malattia, come ha provato pel primo Salvioli (1), il quale aveva già osservato prima di Fränkel la presenza del diplococco nello sputo e nel succo polmonare degli infermi (2).

Il diplococco lanceolato è uno dei più diffusi agenti d'infezione, e si può dire essere l'agente principale delle infiammazioni infettive nel nostro organismo; giacchè, lungi dal localizzarsi soltanto nel polmone, egli dispiega la sua azione patogena, infiammatoria, sia in maniera primitiva che secondaria, in molte altre parti del corpo.

Esso infatti è stato riconosciuto causa di meningite (cerebrospinale epidemica (3)), di endocardite, di sierositi (peritonite, pericardite, pleurite, artrite), di nefrite e di otite media acuta; e finalmente si trova, come ospite comune, nella cavità boccale delle persone sane con molta frequenza, ed è perciò la causa di quella forma di setticemia, così detta « setticemia salivare », prodotta la prima volta da Pasteur nel coniglio, mediante l'innesto sottocutaneo della saliva umana.

Questo microrganismo da alcuni non si vorrebbe classificato fra i micrococchi, perchè la sua forma è per lo più alquanto allungata ed appuntita a mo' di lancetta: siccome però, specialmente nelle culture, appare anche sotto forma tondeggiante e mai sotto quella di vero bastoncino, così val meglio tenerlo fra i micrococchi, e designarlo tutt'al più colla denominazione di « diplococco ovale », come ha fatto Fränkel nella prima descrizione che ha dato delle sue proprietà morfologiche.

E detto « diplococco », perchè è quasi sempre riunito a due oppure in catenelle per lo più di 4 od 8, e talvolta persino di 20 a 30 esemplari (Tav. VIII fig. 1). Queste catenelle si distinguono da quelle dei veri streptococchi, sia perchè non sono ripiegate, ma diritte, ed anche perchè appaiono sempre come catene di diplococchi, essendovi uno spazio maggiore fra le singole paia di microrganismi. La forma di catenella si manifesta specialmente negli stadî di attenuazione del diplococco, e sta forse in relazione con una minore energia e rapidità del processo di scissione.

(1) Salvioli, *Contributo allo studio della natura infettiva della polmonite crupale*, Archivio per le scienze mediche, Vol. 8° 1884, pag. 127.

(2) Salvioli e Zäslein, *Ueber den Mikrokokkus und die Pathogenese der croupösen Pneumonie*, Centralbl. f. d. med. Wiss. 1883, N° 41.

(3) Foà e Bordoni-Uffredduzzi, *Sulla meningite cerebro-spinale epidemica*, Giornale della R. Accademia di Torino, N.° 3-4 1886. — Archivio per le scienze mediche. Vol. 2.°, 1887, N.° 13.

Nell'organismo dell' uomo malato e degli animali inoculati il diplococco manifesta più spiccata la forma di lancetta, ed è provvisto di capsula, la quale si mette in evidenza facilmente coi metodi di colorazione già esposti (pag. 152).

Il diplococco pneumonico non è mobile, e si colora facilmente coi metodi ordinarî ed anche con quello di Gram.

In quanto alle sue proprietà di sviluppo, notiamo anzitutto che è un anaerobio facoltativo, e che al di sotto di 22° C. non si sviluppa. Nella gelatina a 24° C. comincia appena a crescere stentatamente, e il grado ottimo di temperatura è per esso fra 35° e 37° C. È inoltre molto sensibile alla reazione del mezzo nutritivo: se la reazione è acida o alcalina oltre un certo grado, non si sviluppa, e cresce bene soltanto nei mezzi a reazione *debolmente alcalina*.

Il mezzo migliore ove coltivarlo è l'agar, o il siero di sangue. Sulla superficie dell'agar e del siero cresce sotto la forma di coloniette, dapprincipio isolate e semitrasparenti, come goccioline di acqua, difficili ad osservarsi ad occhio nudo. Queste colonie esaminate al microscopio, a ingrandimento debole, appaiono costituite da una parte centrale finamente granulosa, circondata da un alone trasparente. — Cresce bene nel brodo alcalino, a 37° C., producendovi un leggero intorbidamento e si sviluppa anche nel latte sterilizzato con produzione di acido, coagulandolo.

Un' altra caratteristica importante di questo microrganismo è la rapidità con cui perde la virulenza e la vitalità nelle culture: in generale muore dopo 3-5 giorni, raramente dopo un tempo più lungo, e ciò probabilmente in relazione col grado primitivo di virulenza che esso possiede.

Se si vogliono adunque conservare vitali le culture, bisogna operarne il trapianto giornaliero: ma se si vogliono conservare anche virulente, ciò non basta, giacchè dopo un certo numero di trapianti il microrganismo si trova completamente attenuato.

Bisogna perciò ricorrere all'innesto negli animali sensibili (topo, coniglio), nei quali, riproducendosi e infettandoli, mantiene inalterata la sua virulenza. Un altro mezzo più economico, suggerito da Foà (1) per lo stesso scopo, è quello di raccogliere entro provette strozzate il sangue di coniglio infetto, quando esso è moribondo, o appena morto, lasciarlo per 24 ore a 37° C., e poscia saldare colla fiamma le provette e conservarle all'oscuro ed al fresco: in tal guisa il sangue si mantiene virulento fino oltre 45 giorni. Questo me-

(1) Foà, *Sulla infezione da diplococco lanceolato*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. XVII, 1893, pag. 381.

todo offre anche il vantaggio di ottenere la maggiore costanza possibile nelle proprietà biologiche del diplococco, il che è di molta importanza per lo studio della biologia del microrganismo.

Lo stesso fatto, ora segnalato per le culture, si verifica anche pel diplococco che si sviluppa nel polmone ammalato. Si è infatti osservato che, estraendo il succo polmonare dal vivente, si trova in esso più abbondante e più virulento il microrganismo specifico nei primi giorni della malattia, e che in seguito, a grado a grado, si attenua e scompare (1). Questo fatto ci spiega il reperto negativo che si ha talvolta dall'esame microscopico e batteriologico in certi casi di polmonite crupale, relativamente alla presenza del diplococco di Fränkel.

Quando è attenuato, il diplococco cresce abbastanza bene anche nella gelatina a 20-22° C., sotto forma di colonie biancastre, tondeggianti, lungo il canale d'innesto, senza fluidificare la gelatina.

Nelle patate non si sviluppa mai, in nessuna condizione.

Riguardo alle sue proprietà patogeniche, il diplococco pneumonico è uno dei microrganismi più virulenti che si conoscano: basta infatti una piccola quantità di sputo pneumonico, o di essudato polmonare, o meningeo, o di altra provenienza, introdotto sotto la cute di un topo, di un coniglio, o di una cavia giovane, perchè l'animale muoia, per lo più in 24-48 ore, coi fenomeni di una setticemia acutissima.

Nel luogo d'innesto talvolta si ha poca o nessuna reazione, e tal'altra invece (specialmente nel coniglio) si ha un grave edema infiammatorio del tessuto sottocutaneo e del mediastino, oppure un essudato siero-fibrinoso, ricchissimo di diplococchi.

Le caratteristiche più costanti del reperto necroscopico negli animali anzidetti sono: l'enorme quantità di diplococchi capsulati nel sangue, e il tumore di milza. Riguardo a quest'ultimo, nel coniglio si ottengono due varietà di tumore splenico: nell'una la milza è molto ingrossata, di colorito rosso-bruno, consistente, colla superficie di sezione asciutta, ed esaminata al microscopio dimostra gli spazî venosi riempiti di una densa rete di fibrina; nell'altra varietà invece la milza è poco ingrossata, molle e facilmente lacerabile, e l'esame microscopico rivela in essa la presenza di copioso pigmento nella polpa, parte libero e parte incluso nelle cellule.

Non è ancora ben deciso a che cosa si debbano coteste diversità. Secondo Foà (2) le due varietà di tumore splenico sopradescritte deb-

(1) Monti, *Sull'etiologia della polmonite fibrinosa*, Riforma medica, 1888.
(2) Foà, *Ancora sulle varietà biologiche del diplococco lanceolato*. Riforma medica, 1891, N. 268 e 269.

bono ascriversi a proprietà costanti di due varietà diverse di diplococco, delle quali una, così detta « varietà edematogena o tossica », si ricava ordinariamente dall' essudato pneumonico, e produce nei conigli edema infiammatorio della cute (luogo d' innesto) e del mediastino,e tumore molle, congestizio della milza; e l'altra invece, chiamata da Foà « varietà fibrinogena, o settica », si ricava dall'essudato della meningite cerebro-spinale, e non produce nei conigli nessuna reazione locale, ma sibbene li uccide ordinariamente in tre giorni, con un' imponente setticemia e con produzione di tumore duro di milza.

Il quadro morboso sperimentale non è sempre così semplice, giacchè talvolta si hanno localizzazioni infiammatorie nel peritoneo, nella pleura, nelle articolazioni ed anche nell' endocardio (Kruse e Pansini); nel polmone coll' innesto sottocutaneo non si è mai osservato l'insorgere della polmonite. Questa però si è ottenuta coll'iniezione del microrganismo virulento nella trachea del coniglio (Monti), oppure coll' innesto diretto di esso nel polmone, e si può ottenere eziandio coll' innesto sottocutaneo, allorquando però si adoperi il diplococco in via di attenuazione.

Negli animali morti d'infezione sperimentale il diplococco si trova soltanto nell'interno dei vasi sanguigni, e non al di fuori di essi in mezzo agli elementi dei tessuti: si trova inoltre nel contenuto intestinale e talvolta anche nelle orine.

Il quadro morboso ora descritto, di setticemia acuta, corrisponde all'innesto del diplococco virulento. Se questo invece si trova in via di attenuazione, la morte sopravviene più lentamente, e si hanno più frequenti le localizzazioni anzidette, specialmente nel peritoneo e nella pleura, con produzione di essudato siero-fibrinoso e talora anche purulento, come si osserva talvolta anche nell' uomo.

Innestando il diplococco molto attenuato direttamente nei visceri (rene) e nelle sierose (pleura), esso dà luogo ad un processo di neoformazione locale, nodulare, simile a quello della tubercolosi (Foà e Bordoni-Uffreduzzi).

Gli animali più sensibili per l' infezione diplococcica sono, in iscala decrescente, il coniglio, il topo bianco e la cavia: si ritiene da alcuni che il topo bianco sia l'animale più sensibile; ma tenendo conto della quantità di materiale, necessario per produrne la morte, in relazione col peso del corpo dell'animale, si trova che realmente il topo viene in seconda linea, dopo il coniglio. La cavia è meno sensibile, specialmente se adulta; le cavie giovani invece risentono facilmente l'azione del diplococco.

Anche il cane soggiace a questa infezione ; in esso anzi si può

rprodurre coll' innesto endocranico una meningite cerebro-spinale, analoga a quella dell'uomo (Monti). Il pollo e il colombo sono refrattarî all'azione del diploccocco pneumonico.

Quando si voglia adunque stabilire con certezza la diagnosi della presenza del diplococco di Fränkel negli sputi, o in altro materiale patologico, conviene adoperare come animale di prova il coniglio ed il topo bianco; quest'ultimo serve bene a svelare la presenza dei diplococchi, specialmente allorquando questi si trovano in piccolo numero, o in stato di attenuazione, giacchè in tali condizioni riescono più facilmente ad uccidere un piccolo topo che un coniglio.

Nell'uomo si verificano le stesse forme morbose e le stesse localizzazioni svariate, che si ottengono negli animali in seguito all'innesto artificiale del virus. Tali localizzazioni si debbono, con tutta probabilità, in parte alla diversa porta d'ingresso e in parte anche al diverso grado di virulenza del microrganismo. Sono state infatti studiate e descritte numerose varietà biologiche naturali (1) del diplococco capsulato, le quali diversificano alquanto fra di loro, sia per la forma e sia per le proprietà fisio-patogeniche, non però tanto da non dovere restare aggruppate sotto un'unica specie.

Anche nell'uomo si verificano casi di setticemia acuta, con abbondante reperto di diplococchi nel sangue, come negli animali. Nella maggior parte dei casi però il diplococco si trova limitato nell'organo affetto (polmone, pleura, peritoneo, endocardio, meningi, articolazioni, orecchio medio, parotide, rene, ecc.). Il diplococco spiega non di rado un'azione piogena anche nell'uomo (ascessi).

Questo microrganismo nelle culture si mostra assai poco resistente all'azione degli agenti chimici e fisici distruttori; nello sputo invece può resistere lungamente all'azione del disseccamento e della luce solare (2).

Accenniamo infine ad un fatto importante, che in un avvenire, speriamo non lontano, si potrà forse utilmente applicare anche per l'uomo, ed è l'immunità artificiale che si può conferire agli animali contro l' infezione da diplococco, e la guarigione dell'infezione in corso per opera del siero sanguigno degli animali resi immuni.

L'immunità si può produrre in diversi modi: o coll'innesto delle

(1) Banti, *Sopra alcune localizzazioni estrapolmonari del diplococco lanceolato capsulato*, Firenze, 1890. — Kruse u. Pasini. *Untersuchungen über den Diplococcus pneumoniae und vervandte Streptokokken*, Zeitschr. f. Hygiene, Vol. XI, 1892, pag. 279.

(2) Bordoni-Uffreduzzi, *Sulla resistenza del virus pneumonico negli sputi*, Archivio per le scienze mediche, Vol. XV, 1891, pag. 341.

culture attenuate (Foà e Bordoni-Uffreduzzi), o coi prodotti delle culture, oppure coll'estratto dei visceri o del sangue del coniglio infetto, come Foà (1) ed altri hanno ottenuto. — Emmerich e Fowitzky (2) hanno potuto rendere immune il coniglio anche mediante l'iniezione endovenosa di una diluzione, assai tenue, di cultura attiva di diplococco.

Quest'immunità però non è costante, ed è anche di grado diverso a seconda del metodo adoperato per conseguirla. Secondo Foà il mezzo migliore è quello di adoperare l'estratto glicerico del sangue di coniglio infetto, conservato nell'oscurità alla temperatura dell'ambiente per un mese, e iniettato nei conigli nella dose di 2 cc. per 5 giorni consecutivi.

Colle iniezioni del siero di sangue estratto dagli animali resi immuni, quasi contemporaneamente, Foà e Carbone (3), G. ed F. Klemperer (4), ed Emmerich e Fowitzky sono riusciti a produrre la guarigione dell'infezione diplococcica in corso negli animali, come si era già ottenuto per altre infezioni (tetano, difterite, infezione piocianea, ecc.). Si è da alcuni anche tentata l'applicazione terapeutica del siero sanguigno di coniglio immune nell'uomo affetto da pneumonite, ma i risultati finora ottenuti, per quanto debbano dirsi incoraggianti, non permettono ancora di potere da tali esperienze trarre una conclusione positiva.

22. Micrococco della gonorrea (Gonococco di Neisser).

L'importanza eziologica di questo microrganismo scoperto da Neisser (5) nel pus gonorroico, assai discussa per lo addietro in causa specialmente della difficoltà di coltivarlo isolatamente, è stata ora indubbiamente riconosciuta, dopochè, superata felicemente quella difficoltà, si è anche riprodotta nell'uomo la malattia coll'innesto delle culture. — È un micrococco molto grosso (0,5-0,8, μ), di forma ovale, per lo più riunito a due, e colla superficie di contatto appiattita e talora anche incurvata, in modo da prendere un aspetto reniforme, o di fagiuolo. Si colora facilmente col violetto di genziana

(1) Foà e Scabia, *Sulla immunità e sulla terapia della polmonite*. Gazzetta medica di Torino, 1892, N. 13, 14 e 15.

(2) Emmerich u. Fowitzky, *Die künstliche Erzeugung von Immunität gegen croupöse Pneumonie und die Heilung dieser Krankheit*, Münch. med. Wochenschr. N.° 32, 1891.

(3) Foà e Carbone, *Sull'infezione pneumonica*, Atti del 3.° Congresso med. intern. di Roma, Ottobre 1892.

(4) G. u. F. Klemperer, *Versuche über Immunisirung und Heilung bei der Pneumokokken-Infection*, Berl klin. Wochenschr. N.° 34, 35, 1891.

(5) Centralbl. f. d. med. Wiss. N.° 28, 1879.

e coll'azzurro di metilene, e non si colora col metodo di Gram, a differenza dei piogeni ordinarî.

Nel pus gonorroico i gonococchi si trovano contenuti nel protoplasma delle cellule purulente, od epiteliali, e talvolta in così gran numero, da riempire totalmente il corpo cellulare (Tav. VIII, Fig. 4)- è questa un'altra caratteristica che distingue il gonococco dagli altri microrganismi consimili, che si trovano numerosi nel pus insieme con esso. Il gonococco, oltre che nel pus dell'uretrite e della congiuntivite blennorragica, si è pure trovato in alcune complicazioni di quest'ultima malattia, non solo negli organi genitali (ascessi periuretrali, infiammazione delle ghiandole di Bartolini, para- e perimetrite), ma anche in parti lontane da questi, nell'interno dell'organismo. Si è infatti dimostrato che il gonococco può esser causa di gravi complicazioni interne, quali ad es. l'artrite, la pleurite, la pericardite e l'endocardite (1).

La coltura pura di questo microrganismo è stata la prima volta ottenuta da Bumm (2) nel siero umano solidificato, ottenuto dal sangue della placenta. Negli ordinarî mezzi di nutrizione, agar, siero sanguigno degli animali e gelatina, non si sviluppa. L'ottenere però coltivato il gonococco allo stato di purezza, col semplice innesto per strisciamento del pus gonorroico sulla superficie del siero solidificato, riesce talvolta difficile, in causa degli altri microrganismi che si possono trovare in quel pus, e che si sviluppano anch'essi abbondantemente.

Le difficoltà tecniche della coltivazione del gonococco sono state felicemente superate per opera di Wertheim (3), il quale ha trovato che la miscela a parti eguali di siero umano e di agar al 2 % costituisce un buon terreno di nutrizione per tale microrganismo. In tal modo si possono col pus fare le colture piane isolanti, alla maniera ordinaria, ed una volta ottenute le colonie isolate del micrococco, farne il trapianto nella miscela di agar e siero disposta obliquamente nei tubi, oppure nel siero umano solidificato.

Per coltivare il gonococco può anche servire il metodo usato da Pfeiffer pel bacillo dell'influenza, oppure la miscela di agar e di urina (2 di agar 2 %, e 1 di urina sterile (4)), o finalmente

(1) Leyden, *Ueber Endocarditis gonorrhoica*, Deutsche med. Wochenschr. 1892, N. 38.

(2) Bumm, *Der Mikroorganismus der gonorrhoischen Schleimhauterhrankungen « Gonococcus Neisser »*, Wiesbaden, 1887.

(3) Wertheim, *Reinzüchtung des Gonococcus Neisser mittels des Plattenverfahrens*, Deutsche med. Wochenschr. N.° 50, 1891

(4) Ghou u. Schlagenhaufer, *Beitrag zur Züchtung des Gonococcus Neisser*, Wiener klin. Wochenschr. N.° 34, 1893.

la miscela di 1 parte di urina, 2 di siero umano e 6 di agar (1). La cultura pare riesca più facilmente strisciando su questi mezzi un' ansa di pus gonorroico, che diluendo il pus nell' agar col metodo delle colture piane.

La cultura del gonococco sulla miscela di agar e siero si fa rigogliosa sotto forma di coloniette rotonde, trasparenti, simili a goccie di rugiada, dapprincipio isolate, e che poscia confluiscono, ma assai lentamente. La vitalità di queste culture presto si spegne; cosicchè per conservarle bisogna operarne il trapianto non al di là della 3.ª giornata di sviluppo.

Ora adunque che col metodo suddescritto è stata eliminata la difficoltà di ottenere isolato in coltura il gonococco, si può aggiungere anche quello delle culture agli altri criterî diagnostici, che si conoscevano prima come caratteristici del gonococco, e che sono: la forma speciale, la posizione intracellulare, la non colorabilità col metodo di Gram, il non svilupparsi nei mezzi di nutrizione comunemente adoperati, e lo svilupparsi invece coll'aspetto speciale, sopra descritto, sulla miscela di agar e di siero umano.

Coll'innesto delle culture pure del gonococco, la prima volta Bumm, e poscia anche Wertheim ed altri hanno riprodotto nell'uomo la gonorrea colle sue solite manifestazioni cliniche. Negli animali la malattia locale non si riproduce, ma le culture del gonococco iniettate nel peritoneo della cavia producono peritonite, e nell'occhio del coniglio producono *ipopion*.

23. Streptococco della risipola e streptococco piogeno.

Riuniamo in un solo capitolo la descrizione biologica di questi due microrganismi, perchè i caratteri che essi presentano sono tanto simili fra di loro, che per quanto l'uno sia agente di suppurazione e l'altro invece produca una malattia speciale e tipica, come è la risipola, non è possibile stabilire fra essi una qualche distinzione netta, e dobbiamo quindi ammettere che si tratti, o di un unico microrganismo che agisce differentemente secondo la località e secondo la via per la quale penetra, oppure tutt'al più di due varietà di una stessa specie.

Lo streptococco della risipola, così detto di Fehleisen (2), perchè fu questi il primo che lo coltivò dai tessuti ammalati, e ne dimostrò l'importanza patogenica coll'innesto nell'uomo e colla ri-

(1) Steinschneider, *Ueber die Cultur der Gonokokken*, Berl. klin. Wochenschr. 1893 N.° 29 e 30, 1893.
(2) Fehleisen, *Die Aetiologie des Erysipels*, Berlin 1883.

produzione in questo della malattia caratteristica, è un micrococco molto piccolo, perfettamente rotondo, il quale, tanto nelle culture, come nei tessuti animali, si trova raggruppato a catenelle, più o meno lunghe, e talvolta anche lunghissime e intrecciate fra loro (Tav. VIII, fig. 5).

È prevalentemente aerobio, ma cresce anche lungi dall'ossigeno libero, tanto alla temperatura dell'ambiente, come a quella di 30-37° C., ma meglio a quest'ultima.

Nella gelatina cresce lentamente e poco rigogliosamente, senza fluidicarla, sotto forma di piccole colonie, biancastre, rotonde, che si sviluppano isolate lungo il canale d'innesto. Sull'agar e sul siero si sviluppa sotto forma di coloniette semitrasparenti, rotonde, che confluiscono assai lentamente. Sulla patata non si sviluppa, e si sviluppa invece rigoglioso nel brodo a 37°, dove forma un sedimento fioccoso, composto da bellissime catenelle, lasciando limpido il liquido soprastante.

Questo streptococco si incontra in natura diversamente virulento, e nelle culture artificiali si attenua pure rapidamente.

L'innesto delle culture, col quale, come si è detto, Fehleisen ha riprodotto nell'uomo lo sviluppo della risipola, è stato anche applicato a scopo terapeutico per la cura dei tumori maligni, cancro e sarcoma, finora però con esito assai dubbio.

L'innesto sottocutaneo dello streptococco, fatto alla base dell'orecchio di un coniglio, riproduce in questo una risipola sperimentale, che in generale si estende a tutto l'orecchio e poscia rapidamente guarisce: soltanto nei conigli giovani può produrre talvolta suppurazione ed infezione generale. Il topo è refrattario per l'infezione da streptococco.

Nell'uomo l'infezione naturale deve, con ogni probabilità, avvenire attraverso lesioni di continuo dei tegumenti esterni, talvolta anche piccolissime e difficilmente rilevabili coll'osservazione, colle quali può facilmente venire a contatto il microrganismo; questo infatti si trova assai diffuso nel mondo esterno, e si è trovato anche nella saliva, nel muco nasale, nell'uretra e nella vagina di persone sane e normali.

I fenomeni locali della risipola sono dovuti allo sviluppo progressivo dei micrococchi nell'interno dei vasi linfatici, e i fenomeni generali debbono con tutta probabilità riferirsi all'azione di sostanze nocive prodotte dal microrganismo, le quali però non sono state ancora studiate. L'esame microscopico dei tessuti ammalati dimostra la presenza dello streptococco soltanto ai margini della parte lesa, contenuto esclusivamente entro le vie linfatiche, e non nel sangue.

È facile mettere in evidenza la presenza del microrganismo nei tessuti, restando esso colorato col metodo di Gram.

Allorquando lo streptococco agisce come *piogeno*, lo si trova di preferenza nelle suppurazioni così dette *flemmonose*, le quali hanno la tendenza di propagarsi per le vie linfatiche e sono accompagnate da infiammazione delle ghiandole e dei vasi linfatici. Talvolta esso esercita un'azione puramente locale, ma per lo più invece è causa di processi generali, pioemici, eccessivamente gravi. Esso è causa infatti, quasi esclusiva, dell'infezione puerperale, ed in questi casi, circolando nel sangue, può dar luogo a localizzazioni, sempre assai gravi: così, se si arresta nell'endocardio dà luogo ad endocardite, se nel rene ad ascessi metastatici, se nelle articolazioni ad artriti purulente. Esso è inoltre causa sovente di complicazioni morbose in altre malattie, aggravandone generalmente il decorso, come succede nel tifo, nella scarlattina, nella difterite, nella tubercolosi, nella polmonite.

Esso può infine produrre anche la risipola, come ha dimostrato Fränkel (1) almeno pel coniglio, facendo in questo l'innesto collo streptococco isolato dal pus di una peritonite purulenta.

24. Micrococchi piogeni.

Il processo patologico della suppurazione, quale si verifica in condizioni naturali, è sempre accompagnato da microrganismi, che ne sono la causa, e dei quali i più comuni sono certi micrococchi, distinti appunto perciò coll'epiteto di « piogeni ». Ciò non vuol dire che non si possa avere produzione di pus anche senza il concorso di microrganismi; giacchè l'iniezione di sostanze chimiche, fortemente irritanti, come anche l'iniezione dei veleni batterici perfettamente sterili (2), può produrre negli animali la suppurazione; colla differenza però che questa non ha un carattere progressivo, come ha invece quella che si verifica in condizioni naturali, e che è prodotta da microrganismi.

Del resto anche la suppurazione da questi prodotta è in ultima analisi dovuta all'azione di sostanze chimiche, capaci di esercitare una chemiotassi positiva sui leucociti, sostanze le quali, secondo Büchner (3), sarebbero contenute principalmente nel protoplasma

(1) Fränkel E., *Zur Lehre von der Identität des Streptococcus pyogenes und Erysipelatis*, Centralbl. f. Bakteriologie, Vol. VI, 1889, pag. 691.

(2) Scheurlen, *Weitere Untersuchungen über die Entstehung der Eiterung, ihr Verhältniss zu den Ptomaïnen und zur Blutgerinnung*, Fortschritte d. Medicin, 1887, pag. 762.

(3) Buchner, *Ueber eiterungserregende Stoffe in der Bakterienzelle*, Centralbl. f. Bakteriologie, Vol. VIII, 1890, pag. 321.

batterico; egli ne ha infatti dimostrato l'esistenza in un numero grande di cocchi e di bacilli, fra i quali menzioniamo gli stafilococchi piogeni, il bacillo del carbonchio e il pneumobacillo di Friedländer. Koch (1) ha osservato che lo stesso si verifica anche pei bacilli tubercolari, i quali, uccisi col calore ed iniettati sottocute negli animali, esercitano in questi un'azione locale, piogenica.

La proprietà adunque di dar luogo a suppurazione, lungi dall'essere specifica di certi batterî, è invece comune ad un gran numero di essi; così in certe condizioni è piogeno non solo il bacillo della tubercolosi, come si è detto, ma anche quello del moccio, quello del tifo addominale, il *B. coli*, il diplococco pneumonico e così via. E ciò nullameno si continua ancora a designare in maniera speciale coll'epiteto di *piogeni* certi microrganismi, perchè sono questi appunto i fattori più comuni della suppurazione, come è stato dimostrato da numerose osservazioni.

Questi microrganismi piogeni possono esercitare un'azione semplicemente locale, e dar luogo a focolaj suppurativi circoscritti, oppure diffondersi dal punto d'ingresso, per le vie sanguigne o per quelle linfatiche, in tutto l'organismo, e dar luogo a forme gravi d'infezione, conosciute col nome di « piemia » e di « setticemia », dovute principalmente all'azione dei prodotti tossici di tali microrganismi.

Queste diversità nell'azione dei piogeni sono dovute in parte alla via per la quale essi penetrano nell'organismo, e in parte al grado loro di virulenza.

Le vie per le quali penetrano gli agenti piogeni sono molto varie; nella maggior parte dei casi è una soluzione di continuità della pelle o delle mucose, da qualsiasi causa prodotta. Possono però penetrare nell'organismo anche attraverso la pelle intatta, per mezzo dei dotti escretori ghiandolari, come ha provato Garrè (2) su sè stesso, stropicciandosi sul braccio una cultura di pus d'osteomielite, e provocando così la formazione di un vespaio.

Tali batterî sono principalmente lo *streptococco* e gli *stafilococchi* piogeni. Di questi ultimi si conoscono parecchie varietà: l'aureo, l'albo, il citreo, l'albo-cereo e il cereo flavo. Il più importante di tutti però, come agente patogeno, è lo

Stafilococco piogeno aureo,

il quale si è trovato nei furuncoli, nei vespaj, nei paterecci, negli ascessi caldi di qualunque parte del corpo, nell'osteomielite acuta,

(1) Deutsche med. Woch., N° 3, 1891.
(2) Garrè, *Zur Aetiologie acuter eitriger Entzündungen*, Fortschr.d. Medicin, 1885, N.° 6.

nell'endocardite ulcerosa, nella meningite, in certe forme di polmonite, nella pleurite purulenta, nell'oftalmia simpatica, ecc., solo o commisto con altri batterî piogeni. Lo si è anche trovato nella bocca, sulla pelle e nei genitali di persone normali, e nell'aria degli ambienti.

Questo microrganismo, così diffuso e così pericoloso per l'uomo, è stato coltivato la prima volta da Rosenbach (1) dal pus degli ascessi, ed è costituito da cellule sferiche del diametro di 0,7-0,9 μ, aggruppate per lo più in ammassi irregolari, che si colorano facilmente coi metodi ordinarî e restano anche colorati col metodo di Gram.

Lo stafilococco aureo è anaerobio facoltativo, e cresce bene anche alla temperatura dell'ambiente, ma meglio a 30-37^0 C. Cresce nella gelatina, fluidificandola rapidamente; cosicchè, se si tratta di culture piane, isolanti, le colonie giovani di stafilococco, osservate al microscopio, appaiono dapprima sotto la forma di piccoli dischi granulosi, a margini regolari, di color giallo, i quali in seguito si circondano di un alone opaco, formato dalla gelatina liquefatta. Se la cultura è fatta per infissione, la liquefazione avviene in modo irregolare attorno al canale d'innesto, e più rapidamente negli strati superficiali; la gelatina liquefatta è torbida e biancastra, e nel fondo di essa si raccoglie un sedimento viscoso, di colore giallo. Le culture emanano un odore acido, penetrante, simile a quello del latte inacidito. La formazione del pigmento giallo si osserva specialmente nella cultura sull'agar, la quale acquista per ciò un aspetto assai caratteristico, sotto forma di uno strato lucente, di un bel colore giallo-aranciato, che è anche più manifesto nella cultura fatta sviluppare alla temperatura dell'ambiente.

Cresce rigogliosamente sulle patate, formandovi uno strato giallo, spesso e lucente, che emana lo stesso odore speciale, già ricordato. — Nel brodo forma un sedimento, bianco dapprima e che poscia a poco a poco si colora in giallo, lasciando opaco il liquido soprastante. — Nel latte sterilizzato produce acido lattico e coagula la caseina, ridisciogliendola poscia lentamente.

La materia colorante si produce soltanto nelle culture a contatto dell'aria.

Dalle culture di stafilococco Leber (2) ha isolato una sostanza cristallizzabile, da lui chiamata *flogosina*, la quale iniettata negli animali produce suppurazione e necrosi.

(1) Rosenbach, *Mikroorganismen bei den Wundinfectionskrankheiten des Menschen*, Wiesbaden, 1884.

(2) Leber, *Ueber die Entstehung der Entzündung und die Wirkung der entzündungserregenden Schädlichkeiten*, Fortschr. d. Medicin, 1888, pag. 460.

Lo stafilococco aureo è assai resistente all'azione dei mezzi fisici e chimici distruttori. Resiste al disseccamento per oltre 10 giorni, resiste per qualche minuto all'azione del calore umido a 100° C., ed è necessario un grado di concentrazione piuttosto forte dei disinfettanti chimici per distruggerne la vitalità. Nelle culture si mantiene vivente ed attivo per qualche mese.

Come ha osservato Ribbert (1), al quale siamo debitori di studî molteplici ed accurati sulla biologia di questo microrganismo, esso non solo si attenua nelle culture, ma si trova anche in natura dotato di un grado diverso di virulenza. Questo ci spiega in parte il fatto dell'essere lo stafilococco causa di processi morbosi, i quali presentano una gravità estremamente diversa, da quella di un semplice furuncolo, a quella dell'osteomielite acuta, della meningite, dell'endocardite ulcerosa e così via.

Coll'innesto delle culture si possono riprodurre negli animali le stesse forme morbose, che si osservano nell'uomo, causate da questo micrococco. Si è già detto come anche nell'uomo si sia fatto con successo l'innesto delle culture, anche attraverso la pelle intatta. Negli animali gli effetti sono molto diversi, specialmente secondo la via per la quale si introduce il microrganismo, ma anche secondo la quantità e secondo il grado suo di virulenza. L'innesto cutaneo semplice, nel coniglio, nella cavia e nel topo, non è seguito da alcuno effetto. L'innesto sottocutaneo invece produce ascessi locali, e talora anche l'infezione generale e la morte. E così l'innesto fatto nel peritoneo produce infiammazione purulenta locale e spesso anche l'infezione generale. Secondo Grawitz (2) però la peritonite si ha soltanto allorquando insieme collo stafilococco si iniettano i prodotti nocivi del suo ricambio materiale, oppure si lede in altra maniera qualsiasi il peritoneo.

Più interessanti e più svariati sono i risultati che si ottengono coll'iniezione intravenosa dello stafilococco nel coniglio. Gli effetti più comuni che si osservano sono rappresentati dalle artriti purulente, multiple, e dagli ascessi metastatici che si sviluppano nel rene, nel miocardio (Tav. VIII, fig. 6), e talvolta anche nei muscoli volontarî. Nel rene si trovano, per lo più, infarti ed ascessi, dovuti allo sviluppo locale dei micrococchi nei capillari sanguigni; talvolta però si osserva anche un'alterazione diffusa (rene grosso bianco), dovuta all'azione delle tossine (Ribbert).

(1) Ribbert, *Die pathologische Anatomie und die Heilung der durch den Staphylococcus pyogenes aureus hervorgerufenen Erkrankung*, Bonn, 1891.

(2) Grawitz, *Statistischer und experimenteller Beitrag zur Kenntniss der Peritonitis*, Charité-Annalen, 1886.

Anche nel cuore si verificano lesioni estese, corrispondenti a quelle dei reni, sotto forma di focolaj necrotici e di degenerazione grassa diffusa. Nel polmone si trovano spesso infarti emorragici: nella milza si ha soltanto una tumefazione diffusa.

Ma coll'innesto endovenoso si può anche produrre l'endocardite, sia facendo precedere all'iniezione dei microrganismi nel sangue una lesione meccanica delle lacinie valvolari (Orth e Wyssowitsch (1)), e sia anche senza alterare le valvole in nessun modo, ma semplicemente iniettando lo stafilococco sospeso in un liquido contenente particelle solide, fini, in sospensione (Ribbert (2) e Bonome (3)). Se poi all'iniezione si fa precedere la frattura di un osso lungo, senza ledere i tegumenti, si sviluppa nell'animale inoculato un'osteomielite grave, che in generale lo conduce alla morte.

Coll' iniezione delle culture sterilizzate, se fatta con grandi quantità, in modo da produrre la morte dell'animale in poche ore, non si osserva in questo alcuna alterazione macroscopica apprezzabile; ma se l'intossicazione è lenta, si produce degenerazione grassa del cuore e necrosi nei reni.

La gravità delle lesioni prodotte coll'innesto dello stafilococco aureo è in rapporto colla quantità di sostanze tossiche, introdotte colle culture o prodotte dai microrganismi, i quali si depositano localmente nei varî organi e tessuti, e quivi si sviluppano. Coll'assorbimento e colla diffusione rapida delle tossine si spiega la nessuna azione che talora si osserva negli animali, in seguito all' innesto della cultura di stafilococco sottocute o nel peritoneo (Grawitz).

Nell'uomo, come si è detto, si verificano pure le stesse localizzazioni morbose, in diverse parti dell'organismo e di diversa gravità, in relazione colle varie condizioni suesposte: porta d'ingresso, grado di virulenza, quantità dei microrganismi e dei loro prodotti, e finalmente anche predisposizione locale o generale dell'organismo.

Riguardo alla patologia dell'infezione stafilococcica nell'uomo, ricordiamo ancora un fatto importante, quale è la presenza dei micrococci nel sangue circolante e la loro eliminazione coi liquidi di secrezione nei casi gravi di pioemia. Così Karlinski (4) ha constatato la presenza dello stafilococco aureo nel latte di donna affetta da infezione pioemica puerperale e in quello di coniglie gravide, arti-

(1) Wyssokowitsch, *Beitrag zur Lehre von der acuten Endocarditis*, Centralbl f. med. Wiss. 1885, N.° 33, e Virchow's Archiv, 1886, pag. 301.

(2) Ribbert, *Ueber experimentelle Myo-und Endocarditis*, Fortschr. d. Medicin, N.° 1, 1886.

(3) Bonome, *Contribuzione allo studio degli stafilococchi piogeni*, Giornale della R. Accad. di Med. di Torino, N.° 7, 1886.

(4) Karlinski, *Ein experimentellerBeitrag zur Kenntniss der Pyoseptikämie der Neugeborenen von Verdauungstractus aus*, Prager med. Wochenschr. N.° 22, 1890.

ficialmente infette; Brunner (1) e Eiselsberg (2) lo hanno trovato nel sudore, e Tizzoni (3) nel sudore e nell'orina in casi di forme pioemiche gravi.

Questo fatto è importante anche dal punto di vista pratico, sia per le norme di isolamento e di disinfezione da praticarsi in simili casi, e sia per la terapia dell'infezione, potendosi, attivando quelle secrezioni, aiutare l'organismo a liberarsi dagli agenti infettanti. E difatti si è potuto anche sperimentalmente constatare i benefici effetti dell'aumento della secrezione renale, prodotto dalle iniezioni di carbonato sodico, sul decorso dell' infezione stafilococcica nel coniglio (Ribbert).

Lo *stafilococco piogeno albo* non è probabilmente che una varietà di quello aureo, giacchè ha le stesse proprietà di forma e di sviluppo di questo, e se ne distingue soltanto perchè non produce pigmento. Fluidifica più lentamente la gelatina, e manifesta negli animali un potere patogeno meno forte: secondo alcuni (4) però lo stafilococco albo può essere tavolta altrettanto maligno e pericoloso che l' aureo. Si trova soventi volte nel pus commisto coll'aureo, e talora invece insieme colle altre varietà di stafilococchi già menzionati. — Più frequente di tutti però nel pus si trova lo stafilococco aureo, essendone stata dimostrata la presenza nell'ottanta per cento, circa, dei casi presi in esame.

25. Micrococco tetragono.

Fra i piogeni è da annoverare anche una forma speciale di micrococco, trovato la prima volta da Koch nel contenuto delle caverne polmonari dei tisici, e osservato poscia anche nello sputo di questi infermi, nella saliva normale e nel pus di ascessi, il quale, per la disposizione speciale, a gruppi di quattro cellule ciascuno, che assume nell' organismo, è stato detto *micrococco tetragono*. Questi gruppi quadricellulari, che talvolta però sono costituiti anche da due o da tre cellule, sono circondati da una capsula, la quale difficilmente si riesce a mettere in evidenza.

Questo micrococco è aerobio, immobile, e si sviluppa bene alla temperatura dell'ambiente come a 37° C.

(1) Brunner, *Ueber Ausscheidung pathogener Mikroorganismen durch den Schweiss*, Centralbl. f. Bakteriologie, Vol. X, 1891, pag. 172.

(2) Eiselsberg, *Nachweiss von Eiterkokken im Schweisse eines Pyämischen* Berl. klin. Wochensch. N.° 23, 1891.

(3) Tizzoni, *Contributo allo studio delle vie di eliminazione dall'organismo dello stafilococco piogeno aureo*, Riforma medica, N.° 100, 1891.

(4) Levy, *Ueber die Mikroorganismen der Eiterung*, Archiv f. experim. Pathologie und Pharmacologie, Vol. XXIX, 1891, Heft 1-2.

Sulla gelatina cresce bene, alla superficie come lungo il canale d'innesto, sotto forma di colonie tondeggianti, biancastre e splendenti, senza fluidificare la gelatina. Sull'agar e sul siero forma uno strato bianco umido, come sulle patate.

È patogeno pel topo bianco e per la cavia: il primo, inoculato sotto cute, muore dopo 3-6 giorni con fenomeni di setticemia; nella cavia l'infezione si produce più facilmente coll'innesto peritoneale. Il coniglio e le altre razze di topi sono refrattarî.

Nel sangue e in tutti gli organi degli animali infetti si trovano abbondanti i micrococchi, riuniti a quattro e capsulati, che si colorano facilmente anche col metodo di Gram.

26. Actinomyces.

Questo microparassita, la cui classificazione botanica non si può dire ancora stabilita in modo definitivo, ma che, secondo le osservazioni più recenti fatte anche coll'aiuto delle culture, pare debba annoverarsi fra gli ifomiceti, fu descritto anzitutto da Rivolta (1) e da Perroncito (2) nei tumori sarcomatosi della mandibola dei bovini, e studiato poscia più esattamente da Bollinger (3) e da Harz (4) col nome di « *Actinomyces bovis* ».

Nella specie umana questo parassita sembra sia stato veduto la prima volta da Lebert nel 1857, senza però che questi ne riconoscesse la natura: i primi casi positivamente riconosciuti della malattia vennero osservati da Israel (5) e da Ponfick (6) in Germania, e da Perroncito e Reymond in Italia.

La malattia prodotta dalla presenza dell' *Actinomyces* è alquanto diversa negli animali e nell'uomo: nei bovini si forma nel mascellare inferiore, dove più di frequente si manifesta il male, una vera neoformazione d'aspetto sarcomatoso, che ha origine dagli alveoli o dalla parte spongiosa dell'osso, si ingrossa a poco a poco, usurando l'osso stesso, e si apre nella cavità orale e al difuori per mezzo di tragitti fistolosi. Facendo un taglio del tumore, si vede

(1) Rivolta, *Sarcoma fibroso al bordo inferiore della branca mascellare sinistra del bove*, Medico veterinario di Torino 1868, pag. 125.

(2) Perroncito, *Osteosarcoma della mascella anteriore e posteriore dei bovini*, Articolo dell'Enciclopedia agraria italiana, 1875.

(3) Bollinger, *Ueber eine neue Pilzkrankheit beim Rinde*, Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1877, N.° 27.

(4) Harz, *Actinomyces bovis*, Jahresber. d. Königl. Thierarzneisch. zu München, 1878.

(5) Israel, *Neue Beobachtungen auf dem Gebiete der Mycosen des Menschen*, Virchow's Archiv. 1878, Bd. 74, p. 15.

(6) Ponfick, *Ueber eine wahrscheinlich mykotische Form von Wirbelcaries*, Berl. klin. Vochenschr. N.° 23, 1879.

sulla superficie di sezione un gran numero di focolaj gialli, ascessiformi, dai quali col raschiamento si asporta una massa densa, di aspetto purulento, in cui si nota un' infinità di piccoli granuli, bianco-giallastri o giallo-solfo, grossi all'incirca come un capo di spillo, i quali non sono altro che un aggregato di globetti del fungo parassitario.

Non di rado il parassita invade anche la lingua, dove forma nodosità che si ulcerano e poscia guariscono, lasciando cicatrici fibrose e deformi. I tumori attinomicotici si possono trovare negli animali, sebbene meno di frequente, anche nelle labbra, nella faringe, nella laringe, nel polmone, nello stomaco, nell'intestino, nel fegato, nella pelle e persino nei muscoli, e per l'aspetto loro macroscopico possono venire scambiati coi nodi tubercolari: l' esame microscopico serve però a mettere in chiaro la loro vera natura.

Nell'uomo il quadro morboso cambia alquanto. Si ha nel punto d'ingresso del parassita una tumefazione, ma non un vero tumore; la malattia si estende piuttosto in superficie ed in profondità, coi caratteri di un'infiammazione cronica suppurativa. L'infiltrazione è costituita da tessuto di granulazione, di aspetto lardaceo: vi si produce pus, che si fa strada attraverso tragitti fistolosi, i quali contengono appunto il liquido puriforme con quei corpicciuoli giallo-solfo, che permettono di fare la diagnosi della malattia. Quando questa ha origine dai denti cariati e dalle ossa mascellari, come pare sia il caso più frequente, l'infiltrazione purulenta si può estendere lungo i vasi del collo, raccogliersi attorno alle costole o in vicinanza dei corpi vertebrali, che ne sono usurati, e quivi formare nuovi ascessi e tragitti fistolosi, che si aprono all'esterno. Le nodosità formate dallo sviluppo del fungo possono anche, come talora si è osservato, usurare le pareti di grossi vasi venosi (della giugulare, ad es.), e produrre così la diffusione metastatica della malattia.

Non si deve credere che questa sia sempre localizzata alla mandibola o alla colonna vertebrale; il parassita può svilupparsi primitivamente in qualsiasi parte del corpo, secondo la porta d'ingresso. Si sono infatti descritti casi di peritonite lenta attinomicotica, in cui il parassita era penetrato per la via del canale intestinale o per quella dell'apparecchio genitale (Zemann (1)), casi di attinomicosi limitata del colon (Chiari (2)) e di penetrazione del pa-

(1) Zemann, *Ueber die Actinomycose des Bauchfells und der Baucheingeweide beim Menschen*, Wien. med. Jahrb. 1883, p. 477.

(2) Chiari, *Ueber primäre Darmactinomycose des Menschen*, Prag. med. Woch. 1884, N.° 16.

rassita dalla pelle. In altri casi (Canali (1) e Hanau (2)) si ebbe pure lo sviluppo primitivo del parassita nel polmone.

Negli animali, e probabilmente anche nell'uomo, l'*actinomyces* nella maggior parte dei casi penetra nella bocca cogli alimenti, dove si fa strada nei tessuti, o per mezzo di piccole lesioni di continuo, prodotte da quelli nella mucosa orale, o per la via dei denti cariati. Sonvi infatti osservazioni abbastanza numerose di casi di attinomicosi, sia negli animali, come nell' uomo, sviluppata in seguito all' infissione nei tessuti di foraggi secchi. Citiamo, ad esempio, il caso descritto da Fischer (3) di attinomicosi dell'uomo, in cui il parassita era stato indubbiamente innestato nella lingua per mezzo della resta di un grano d'orzo.

La ricerca di questo parassita ha una grande importanza, non solo nei casi di malattia dell'uomo, perchè facendo la diagnosi in tempo si può coll 'intervento chirurgico salvare il paziente, ma anche per l'esame delle carni degli animali domestici destinati all'alimentazione, e specialmente del maiale, nel quale la malattia pare s'incontri più di frequente di quanto prima si credeva. È però ancora dubbio se nei casi osservati da Duncker (4) si tratti della stessa forma di *actinomyces* che si riscontra parassitaria nel bove e nell'uomo.

Per osservare il parassita, si prende qualcuno di quei piccoli granuli, color giallo-solfo, che si trovano nel pus, e si schiacciano delicatamente fra un vetrino portoggetti e un coproggetti, senza aggiungere alcun liquido, perchè talvolta basta persino l'acqua distillata per alterare gli elementi del fungo (Israel), oppure, se il pus è molto denso e vischioso, aggiungendo una soluzione tenue di potassa, la quale generalmente non altera l'*actinomyces*.

Talvolta, specialmente quando si esamina il succo purulento dei tumori attinomicotici dei bovini, bisogna aggiungere al preparato un poco di acido cloridrico allungato, per disciogliere i sali di calce, di cui sono spesso infiltrati gli ammassi del fungo.

Ognuno di quei granuli risulta composto da un aggregato di globetti di *actinomyces*, ed ogni globetto ha la forma di una mora ed è composto nel centro da un ammasso fitto di filamenti del fungo, sottili e ramificati, i quali si dirigono in direzione raggiata verso la

(1) Canali, *La bronco-attinomicosi nell'uomo*, Riv. clinica di Bologna, 1882 p. 588 Con una nota di Majocchi sopra un caso di attinomicosi della pelle.

(2) Hanau, *Zwei Fälle von Aktinomycose*, Correspondenz-blatt f. Schweizer Aerzte. 1889, pag. 165.

(3) Fischer, *Beitrag zur Aetiologie der Aktinomycose*, Centralblatt f. Chirurgie, 1890, N.° 22.

(4) Duncker, *Strahlenpilze im Schweinefleisch*, Zeitschr. f. Mikrosk. u. Fleischbeschau, III, 1884, N.° 3.

periferia, terminando in un rigonfiamento claviforme, con contenuto giallognolo e splendente. Commisti a questi elementi si trovano anche corpi cocciformi di varia grandezza, e per lo più i micrococchi piogeni.

Nelle sezioni dei pezzi patologici, induriti nell'alcool, o nel liquido di Müller, o nell'acido osmico 1% (Israel), gli ammassi del fungo si vedono bene anche senza colorazione; ma i preparati colorati coi metodi già esposti riescono sempre più dimostrativi (Tav. VIII, fig. 8).

Come si è detto, la classificazione botanica di questo fungo non è ancora definitivamente stabilita. Secondo alcuni, nelle culture artificiali il fungo si sviluppa sotto forma di filamenti, costituiti da bastoncini lunghi e corti (Wolff e Israel), e sarebbe quindi da riporsi fra i « batterî polimorfi »; e secondo altri invece le particolarità morfologiche del fungo nelle culture corrispondono a quelle degli ifomiceti, sotto forma di filamenti ramificati, alcuni semplicemente vegetativi ed altri fruttiferi o sporigeni, e il microrganismo apparterrebbe perciò al genere *Streptotrix* (1). I rigonfiamenti claviformi, i quali si osservano molto spesso, ma non sempre, nel fungo sviluppato nell'organismo animale, sarebbero, secondo l'opinione più accreditata di Boström (2) e di altri, non già organi di riproduzione (conidi), ma semplici forme degenerative, che si producono soltanto nell'organismo animale, in causa forse delle difficoltà opposte all'accrescimento del fungo ed alla sua vitalità dal tessuto che lo circonda.

La coltivazione artificiale di questo microrganismo è stata tentata da molti con diverso risultato, ora, cioè, negativo ed ora invece positivo. Israel (3) sembra essere stato il primo ad ottenere la cultura dell'*actinomyces* sul siero di sangue coagulato, ma Wolff e Israel (4) furono quelli che diedero per primi una descrizione particolareggiata delle proprietà di sviluppo del fungo nei varî mezzi di nutrizione, ottenendone la cultura nell'agar col metodo anaerobico di Buchner, e riuscendo anche a riprodurre la malattia negli animali col prodotto delle loro culture. Notiamo però che la cultura artificiale del fungo non sempre riesce, per motivi ancora ignoti, e che talora si è ottenuta da tumori, nei quali l'*actinomyces* era

(1) Gasperini, *Ricerche morfologiche e biologiche sul genere Actinomyces-Harz*, Annali dell'Istituto d'igiene dell'Università di Roma, fasc. III, 1892.

(2) Boström, *Untersuchungen über die Actinomycose des Menschen*, Ziegler's Beiträge zur path. Anat., ecc., Vol. IX, 1890, Heft 2.

(3) Israel O., *Ueber die Cultivirbarkeit des Actinomyces*, Virchow's Archiv, Vol. 35, pag. 140, 1884.

(4) Wolff u. Israel, *Ueber Reincultur des Aktinomyces und seine Uebertragbarkeit auf Thiere*, Virchow's Archiv, Vol. 126, 1891, p. 11.

commisto ai micrococchi piogeni, ed è fallita invece in casi in cui non v'erano altri microrganismi.

L'*actinomyces* è anaerobio facoltativo, e cresce sull'agar a 37° C. sotto forma di nodi isolati, di forma sferica, più o meno regolare, prominenti sulla superficie del mezzo, bianco-giallastri, i quali crescono lentamente, non confluiscono e si approfondano nell'agar, a cui restano aderenti tenacemente. La superficie di questi nodi è solcata da depressioni che dal centro vanno verso la periferia, a mo' di rosetta. Nelle culture anaerobiche lo sviluppo è più rigoglioso.

Cresce anche nel brodo alcalino a 37°, sotto forma di fiocchi biancastri che si depositano al fondo, lasciando limpido il liquido soprastante.

Nella gelatina, come nell'agar, a 16-20° C., non si sviluppa.

L'*actinomyces* si mantiene vitale nelle culture lungamente (secondo Wolff e Israel, fino a 9 mesi).

L'esame microscopico delle culture nell'agar dimostra in esse la presenza di bastoncini, corti e lunghi, omogenei o segmentati, di filamenti semplici o divisi dicotomicamente, diritti e ondulati, talvolta ravvolti a spira, e finalmente anche di elementi tondeggianti cocciformi, i quali si trovano specialmente abbondanti nelle vecchie culture. All'estremità dei bastoncini o dei filamenti si osserva talora un ringonfiamento, rotondo od ovale, non molto grande, che si comporta coi colori d'anilina come tutte le altre forme.

Nelle culture fatte nelle uova si osservano le stesse forme, ma prevalgono specialmente i filamenti lunghi e fittamente intrecciati.

Nelle culture, in qualunque mezzo sieno fatte, non si trova manulla che rassomigli alle clave di cui è munito il parassita nell'organismo animale. Wolff e Israel non hanno neppure potuto constatare in quelle l'esistenza di una fase di sporificazione, mentre invece, secondo altri (Gasperini), i filamenti sono in parte fruttiferi e sporigeni. — Notiamo finalmente che i caratteri delle culture dei scritti dai diversi osservatori sono abbastanza differenti, e che non può dirsi ancora deciso se ciò dipenda dall'esistenza di parecchie varietà del fungo, oppure semplicemente dalla variabilità morfologica di esso.

L'importanza specifica di questo microrganismo per la malattia nella quale si osserva è stata anzitutto stabilita colle esperienze fatte negli animali col materiale patologico (Israel, Ponfick), ed è stata anche confermata coll'innesto delle culture (Wolff e Israel) fatto nel peritoneo delle cavie e dei conigli, nei quali si sono sviluppati

tumori, corrispondenti perfettamente a quelli che si osservano nell'uomo e nel bove.

27. Streptotrix (?) farcinica (Nocard).

Questo microrganismo è stato scoperto da Nocard (1) come causa di una malattia lenta del bue, comune specialmente nella Guadalupa, distinta col nome di « farcino del bue » e caratterizzata da infiammazione suppurativa dei vasi e dei gangli linfatici superficiali, la quale, durando a lungo, produce infine il marasma, propagandosi anche agli organi interni, milza, fegato e polmone, dove si formano nodi con contenuto caseoso-purulento, simili a quelli tubercolari. Una tal malattia, che ha nulla a che fare colla morva o farcino degli equini, e che si era creduta di natura tubercolare, si deve invece, come ha provato Nocard, ad un microrganismo speciale, il quale, secondo i caratteri morfologici e delle culture, è molto simile all'*actinomyces*, e deve quindi probabilmente ascriversi al gruppo *Streptotrix*.

Questo microrganismo, sia nel pus proveniente dai buoi ammalati, come nei tessuti degli animali inoculati colle culture pure, l'uno e gli altri colorati col metodo Gram-Weigert, si mostra sotto forma di densi ammassi rotondeggianti, costituiti da sottili filamenti, intrecciantisi in ogni senso, così fitti nella parte centrale, che questa offre l'aspetto di un nucleo opaco, colorato, da cui si irradiano perifericamente una miriade di fini prolungamenti ramificati (Tav. VI, Fig. 5).

Questi ammassi si colorano bene colle soluzioni Ehrlich, ma si decolorano anche facilmente coll'alcool; il miglior metodo per colorarli è quello di Gram colla modificazione di Weigert (olio d'anilina).

Il microrganismo coltivato da Nocard è aerobio, e si sviluppa bene nell'agar, nel siero, sulle patate e nel brodo, a temperatura non inferiore ai 30.° C. (fra 30.° e 40.° C.).

La maniera con cui si sviluppa sulla superficie dell'agar è affatto caratteristica. La cultura si manifesta dapprima sotto forma di placche secche, rotondeggianti, prominenti sulla superficie dell'agar, di aspetto opaco, come polveroso, più spesse alla periferia che nel centro, le quali confluendo finiscono di ricoprire l'agar di una membrana bianco-giallastra, secca e grossolanamente increspata. Nel siero la cultura ha lo stesso aspetto che nell'agar; sulle patate si manifesta sotto forma di placche scagliose, secche e molto sporgenti sulla superficie. Nel brodo cresce sotto forma di ammassi biancastri, alcuni dei quali precipitano al fondo, mentre altri, restando alla superficie, finiscono, a poco a poco, col coprirla di uno strato simile a quello descritto sull'agar.

Qualunque sia il mezzo in cui si è fatto sviluppare, il microrganismo, osservato al microscopio, si presenta sempre collo stesso aspetto di ammassi tondeggianti, fittamente intrecciati, come nei tessuti animali, i cui filamenti, colorati, mostrano una struttura granulare (Tav. VI, fig. 4).

Le colture si mostrano patogene pel bue, pel montone e per la cavia; il cane, il gatto, il coniglio ne sono invece refrattarî.

Specialmente interessante è il reperto anatomico delle cavie inoculate con questo microrganismo, giacchè macroscopicamente è affatto simile a quello della tubercolosi, specialmente se l'innesto è fatto nei vasi sanguigni. In tal caso infatti l'animale muore dopo 5 a 20 giorni, e alla necroscopia si trovano i muscoli e tutti

(1) Nocard, *Note sur la maladie des boeufs de la Guadeloupe*, Annales de l'Institut Pasteur 1888, pag 293.

i visceri interni, specialmente il polmone, il fegato e la milza, infiltrati di un gran numero di noduli biancastri, tubercoliformi, nella cui parte centrale l'esame microscopico, coll'aiuto del metodo di colorazione già detto, rivela uno o più ammassi caratteristici di filamenti.

Se l'innesto si fa nel peritoneo, l'animale muore egualmente, e si trova tutto quanto il mesenterio e il peritoneo che riveste i visceri dell' addome gremito di noduli pseudotubercolari. Questi però non si trovano nell'interno dei visceri (fegato, milza, ecc.) e neppure nella cavità toracica.

Se poi l'innesto si fa sottocute, si ha un ascesso locale, accompagnato da infiammazione, con induramento e suppurazione dei vasi e ghiandole linfatiche vicine, ma l'animale non muore, perchè la malattia non si generalizza che in casi eccezionali. Il decorso dell'infezione sottocutanea sperimentale corrisponde adunque precisamente a quello della malattia spontanea nei bovini.

Di altri microrganismi patogeni, simili a quelli precedentemente descritti, e appartenenti quindi probabilmente allo stesso genere (*Streptotrix*), ricordiamo quello isolato da Eppinger (1) da un ascesso cerebrale, e da lui trovato virulento per le cavie e pei conigli, nei quali è capace di produrre una forma di pseudotubercolosi, nonchè l'altro isolato da Schmorl (2) dai conigli, nei quali si era svolta un'epidemia spontanea, che risultò appunto prodotta dal microrganismo che Schmorl caratterizza col nome di *Streptotrix cuniculi*.

28. Ifomiceti Patogeni

Vi sono finalmente anche alcune specie di *ifomiceti*, ben caratterizzati come tali, i quali sono capaci di vivere e di moltiplicarsi nell'organismo animale vivente e di esercitare quindi su di esso un'azione patogena: tali specie appartengono principalmente alla famiglia delle Aspergilline, delle Mucorinee e degli Oidii, che si distinguono fra di loro pel modo speciale di sporificazione. Negli aspergilli havvi un ifo fruttifero, il quale termina con un rigonfiamento, sulla cui superficie sono attaccate le spore: nelle mucorinee l'ifo fruttifero porta una specie di capsula, detta *sporangio*, entro il quale si sviluppano le spore; negli oidii poi le spore si formano nell'interno degli ifi, senza alcun organo speciale.

Se si inietta nelle vene di un coniglio una sospensione piuttosto densa di spore di *aspergillus fumigatus* o *flavescens*, o di *mucor rhyzopodiformis o corymbifer*, l'animale dopo pochi giorni ne muore, e alla necroscopia si trova che gli organi interni, e di questi specialmente il rene ed il fegato, sono cosparsi di nodicini biancastri, i quali al microscopio si rivelano composti di miceli del fungo, sviluppatisi dalle spore iniettate, che si sono soffermate nei capillari sanguigni. Nell'interno dell'organismo animale questi funghi non formano mai spore.

La fig. 7 della Tav. VIII rappresenta appunto una sezione di

(1) Eppinger, *Ueber eine neue pathogene Cladothrix und eine durch sie hervorgerufene Pseudotuberculosis*, Ziegler's Beiträge, ecc., Vol. IX, 1890.

(2) Schmorl, *Ueber ein pathogenes Fadenbacterium* (*Strepthothrix cuniculi*) Deutsche Zeitschr. f. Thiermed. u. vergleich. Pathol. Vol. 17, 1891.

rene di coniglio, morto per infezione aspergillina, colorata colla soluzione Löffler di azzurro di metilene.

Negli uccelli si osserva non di rado spontaneamente la cosidetta « *pneumomicosi aspergillina* », ed anche sperimentalmente si può produrre in essi l'infiammazione polmonare, mediante l'inalazione delle spore di *aspergillus fumigatus*.

Anche nell'uomo si sono osservati casi di micosi aspergellina o mucorinea, specialmente nel condotto uditivo esterno, nella cornea, nelle cavità nasali, e talvolta anche negli organi interni (polmone, intestino, cervello). — Questi funghi si coltivano bene, specialmente nella pappa di pane a 37° C.

Ma gli ifomiceti patogeni più importanti per noi, perchè riconosciuti causa di malattie parassitarie della pelle nell'uomo, sono il fungo della **tigna favosa** e quello dell'**erpete tonsurante**, appartenenti ambedue al gruppo degli oidii.

Il fungo della tigna favosa, scoperto da Schönlein nel 1839, porta ancora dal suo scopritore il nome di *Achorion Schönleinii*, e si trova abbondante sotto forma di filamenti e di spore nelle croste gialle (scuti) che coprono la superficie della pelle ammalata e nei peli, specialmente nella radice e nelle sue guaine. Per l'osservazione microscopica basta prendere un pezzetto di crosta, dilacerarlo finalmente cogli aghi in una goccia d'acqua acidulata con acido acetico, oppure in una goccia di glicerina, coprire il tutto con un coproggetti ed osservarlo senz'altro al microscopio coll'obbiettivo ad immersione. Si può anche fare la dilacerazione in una soluzione di potassa, aggiungere ad essa un poco di glicerina ed osservare al microscopio, senza bisogno di ricorrere all'aiuto dei reattivi coloranti. I peli si osservano semplicemente in una goccia di glicerina, dopo averli fatti rammollire nella potassa.

L'aspetto del fungo, quale è disegnato nella fig. 9 della tav. VIII, è piuttosto vario e difficile a descriversi con parole: esso è costituito da due sorta di micelì, alcuni sottili, omogenei e ramificati, ed altri invece più grossi, segmentati, con un contenuto granulare, i quali rappresentano gli ifi fruttiferi, giacchè in essi ha luogo la formazione dei conidì. Nelle colture, specialmente se fatte nella gelatina e nell'agar, oltre a queste forme, si osservano all'estremità degl'ifi, o nel loro decorso, rigonfiamenti rotondeggianti con un contorno semplice o doppio, splendente, e a contenuto protoplasmatico finamente granulare e splendente: questi rigonfiamenti, così detti da Kràl (1) « corpuscoli gialli » pel colorito giallastro che ha il loro

(1) Kràl, *Untersuchungen über Favus — Mikologischer Theil*, Ergänzungshefte zum Archiv f. Dermatol. u. Syphilis, 1891, I, Heft.

contenuto, rappresentano, anche secondo l'opinione di Plaut (1) che li ha studiati attentamente, forme anomale, degenerative, dello sviluppo del fungo, e la loro comparsa precede la fase di produzione dei conidì (sporificazione). Questi appaiono sotto forma di corpi rettangolari, od ovali, o tondeggianti, riuniti insieme, finchè una causa esterna non li disgrega, in forma di filamenti ramificati come gli ifi, nei quali si producono; in questi il processo di segmentazione rappresenta lo stadio preliminare della sporificazione.

La maniera di svilupparsi del fungo nei mezzi di nutrizione, solidi e liquidi, è stata diversamente descritta dagli osservatori; tanto che alcuni di essi hanno ammesso l'esistenza di parecchie varietà, o specie, di questo parassita (Quincke (2) Frank (3)). Ricerche ulteriori però hanno dimostrato che possono esservi notevoli differenze nell'aspetto che assume la colonia del fungo nei mezzi di nutrizione, specialmente solidi, anche semplicemente secondo le proprietà fisiche di essi (umidità o secchezza della superficie, spessore, ecc.); cosicchè, forse a maggior ragione, si ritiene ora da molti (Mibelli (4), Kral, ecc.) che la tigna favosa dell'uomo sia sempre prodotta da unico microrganismo.

La gelatina costituisce un mezzo poco favorevole per lo sviluppo dell'*Achorion* perchè questo cresce meglio a 30°-37° C. che alla temperatura dell'ambiente. Vi cresce infatti con straordinaria lentezza e la colonia assume la forma di un piccolo bottone giallastro, circondato da filamenti che si approfondano nella gelatina, che si scioglie attorno a quella assai lentamente. Per ottenere il microrganismo coltivato dal materiale patologico allo stato di purezza, vale quindi assai meglio l'agar, e si possono per ciò adoperare due metodi diversi, a seconda che si prende il pelo, oppure il materiale della crosta. Nel primo caso si strappano colla pinzetta dalla parte ammalata i peli che appaiono di colorito più chiaro, e con forbici sterilizzate se ne taglia la radice, che si raccoglie coll'ago di platino e si depone senz'altro sulla superficie dell'agar disposta nei tubi a becco di clarinetto. Innestando così un certo numero di tubi di agar, si ottiene sempre in qualcuno di essi lo sviluppo del fungo allo stato di purezza.

Il metodo però più esatto e più sicuro, per ottenere la cultura

(1) Plaut, *Beitrag zur Favusfrage*, Centralbl. f. Bakteriologie, 1892, Vol. XI, N.° 12.

(2) Quincke, *Ueber Favuspilz*, Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie, Vol. XXII, 1887, pag. 62.

(3) Frank, *Favus*, Monatshefte f. prakt. Dermatologie, 1891, N.° 6, pag. 254.

(4) Mibelli, *Sul fungo del favo*, Riforma medica, N.° 69 e 79, 1891.

pura del fungo, è quello di prendere un pezzetto di crosta e fare da questa le culture isolanti nell'agar col metodo classico di Koch. Per disgregare il materiale delle croste meglio di tutti serve il mezzo proposto da Kral, di pestarlo finamente in un mortaio insieme colla polvere di acido silicico sterilizzata: si prendono di questa miscela 1 o 2 anse di platino, inumidendo l'ago, e si fanno tre diluzioni nell'agar fuso a 42°, secondo il metodo già noto, versando poscia l'agar nelle scatole di Petri.

Nell'agar a 32° il fungo cresce sotto forma di colonie isolate, dense, prominenti sulla superficie del mezzo, grigiastre dapprima e poscia giallastre, circondate da una fitta barba di filamenti, che si approfondano nell'agar e fanno sì che la colonia aderisca ad essa tenacemente. Quando la colonia ha raggiunto un certo diametro ($^1/_2$ cm.), la sua superficie si fa grinzosa ed asciutta (Tav. I, fig. 2). Questa maniera di svilupparsi sull'agar del fungo della tigna favosa è alquanto diversa da quella del *tricophyton tonsurans*, il quale coltivato egualmente ha un aspetto simile a quello delle muffe ordinarie, formando colonie non prominenti sulla superficie e coperte da una specie di peluria biancastra (Tav. I, fig. 1).

Sul siero di sangue solido il fungo del favo cresce più lentamente che nell'agar, ma con aspetto simile; soltanto il colorito della colonia è in principio più bianchiccio, ed in seguito diventa grigio-giallastro.

Sulle patate forma colonie prominenti, bianco-gialliccie, fortemente aderenti.

Nel brodo alcalino si sviluppa specialmente nella profondità del tubo. Cresce anche nel latte a 37°, lasciandolo inalterato in principio e producendone poscia la coagulazione (dopo 20-25 giorni). L'osservazione microscopica del fungo, fatto sviluppare in tutti i varî mezzi sopraccennati, a 37° C., dimostra in principio la presenza di ifi ramificati, non segmentati, a contenuto omogeneo o leggermente granuloso, ed in seguito l'ingrossamento degli ifi, la comparsa dei corpi gialli a contenuto granuloso, la segmentazione degli ifi e la formazione dei conidì. Queste diverse fasi si osservano bene specialmente nelle culture fatte sull'agar e sul siero di sangue.

L'innesto delle culture del fungo sulla pelle dell'uomo è seguito dallo sviluppo tipico della malattia, quale si osserva spontaneamente, purchè però sia fatto allorquando si è già compiuta in esso la fase di sporificazione (Grawitz, Plaut).

Il *tricophyton tonsurans* (Tav. VIII, fig. 10) è un ifomiceta, che appare tanto simile per l'aspetto microscopicoa ll'*Achorion*, che sarebbe inutile ripeterne qui la descrizione.

Nelle culture in agar macroscopicamente si differenzia per alcuni caratteri, già esposti, ai quali si può aggiungere anche il colore giallo-solfo che ha la superficie inferiore della colonia del *tricophyton* in confronto di quello giallo chiaro dell'*Achorion*.

Gli elementi del *tricophyton*, moltiplicandosi nell' epidermide, dànno luogo al così detto *herpes circinnatus*, e penetrando nell'interno dei peli li rendono fragili e ne determinano la caduta, producendosi così l'*herpes tonsurans*, o la *sicosi*, o *mentagra*. Nei peli il fungo si sviluppa, a differenza dell'*Achorion*, sotto forma di conidì, specialmente nella sostanza corticale dello scapo.

Per rintracciare il parassita nelle diverse forme cliniche di malattia che esso produce, si rammolliscono prima nella potassa le squame epidermoidali distaccate dalla pelle malata, e si dilacerano poscia in una goccia di glicerina: per osservarlo nei peli, si scelgono quelli che appaiono più chiari, e si esaminano nella glicerina acidulata con acido acetico, digrassandoli prima, se occorre, coll'etere o colla trementina.

Un altro ifomiceta patogeno della pelle è il *microsporon furfur*, il quale produce la *pityriasis versicolor*.

L'esame del fungo negli strati epidermici superficiali si fa, come si è detto per quelli precedenti, raschiando l'epidermide dai punti macchiati. Gli elementi del fungo sono costituiti da conidî rotondeggianti, riuniti a gruppi, e da filamenti articolati, raramente ramificati, che si dispongono fra le cellule epidermiche.

La cultura artificiale di questo fungo e la riproduzione della malattia coll'innesto di quella mancano ancora.

Accenniamo finalmente ad un ifomiceta che si riscontra parassitario nell'uomo, e che è causa di una malattia endemica nell'India, conosciuta col nome di « *piede di madura* ». Questo fungo è stato chiamato *Chionyphe* da Carter, ed è costituito da filamenti ramificati tenuti assieme da una sostanza bruna, assai dura, che impartisce agli ammassi del fungo l'aspetto di granuli duri, nerastri, della grossezza da un grano di miglio ad un pisello, ed anche di più.

Il fungo, penetrando nel derma e nel tessuto sottocutaneo del piede per mezzo di ferite, vi produce un'infiammazione purulenta, con produzione di tessuto di granulazione e di tragitti fistolosi, simile a ciò che si osserva nell'attinomicosi, propagandosi talora anche alle ossa.

Un caso di questa malattia è stato osservato e descritto in Italia da Bassini (1).

(1) Bassini, *Un caso di micetoma al piede, o piede di madura*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. XII, 1888, pag. 309.

29. Protozoi parassitarî.

Un altro gruppo di microrganismi patogeni, a cui si è rivolta l'attenzione specialmente in questi ultimi anni, è rappresentato da esseri appartenenti all'ultimo gradino della scala zoologica, distinti appunto col nome di *Protozoi*.

Di alcuni di questi non è ancora sicuramente stabilita l'importanza patogenica, e qui perciò ne faremo cenno specialmente come oggetto di studî ulteriori. Tali sono certe forme, simili a sporozoi, che si trovano incluse nelle *cellule cancerose*, osservate e studiate da molti in questi ultimi tempi, alle quali si tende sempre più a dare il significato di parassiti. In verità molti di tali corpi inclusi sono dovuti indubbiamente a fenomeni di fagocitismo o di degenerazione nucleare, ma ne esistono altri, i quali non si possono interpretare in quel modo, e neppure come costituenti normali del protoplasma cellulare (cariosomi): per questi ultimi è verosimile ammettere si tratti di corpi stranieri, e l'ipotesi più razionale sembra finora essere quella che attribuisce loro il significato di parassiti.

Se ne trovano segnatamente nei cancri ghiandolari, e riesce invece assai difficile dimostrarli nei cancri derivati dagli epitelî di rivestimento. Sono corpicciuoli paranucleari, che si trovano in diverso numero nel protoplasma di cellule cancerose ben conservate, e che sembrano costituiti da un nucleo, da protoplasma e da una capsula a doppio contorno. Il nucleo nei corpi più piccoli apparisce come un granulo, il quale in seguito si ingrossa ed occupa buona parte del corpicciuolo. Il protoplasma nei corpi più giovani è assai sottile e alla periferia si dispone a festoni, in modo che tutto il corpo prende quell'aspetto che dicesi « a coccarda »; altre volte, ma raramente, il protoplasma si presenta assai regolarmente segmentato a mo' di rosetta. L'ingrossamento del nucleo coincide colla scomparsa progressiva del protoplasma, e allora il corpicciuolo appare come una cisti, contenente un nucleo e limitata da una capsula che racchiude uno spazio incoloro attorno al nucleo stesso. In alcuni casi pare che il nucleo si divida in tanti corpicciuoli rotondi, che potrebbero avere il significato di spore. È incerto se esista una fase endonucleare del parassita.

E importante da notarsi il fatto, che queste forme parassitarie non si trovano uniformemente distribuite nel cancro, ma si osservano invece isolate in alcuni gruppi di alveoli cellulari, e molto irregolarmente distribuite nel tumore. Questo fatto obbliga il ricercatore

ad eseguire un gran numero di preparati, ed a sottoporli a un diligente esame microscopico in tutta la loro estensione.

Per mettere in evidenza i corpi inclusi nelle cellule cancerose i metodi migliori, secondo l'esperienza che ne ha fatto Foà (1), il quale ha illustrato l'argomento con studî molto importanti, sono i seguenti:

1.° Piccoli pezzetti di tumore, appena esportato, si fissano per 15-24 ore nel liquido di Hermann (acido osmico 2 % parti 2, cloruro di platino 1 % p. 7, acido acetico puro p. 1) e le sezioni si colorano sul portoggetti con una miscela così composta:

Soluzione buona di ematossilina . . .	parti	5
» idralcool. di safranina 1 %. .	»	2
Acqua distillata	»	20

Filtra una volta.

La miscela si lascia sul preparato per 4-6 ore, si lava, si tratta con alcool picrico concentrato, e poscia con alcool assoluto, silolo e balsamo. Talora, dopo aver trattato il preparato con alcool picrico leggero, si aggiunge per qualche minuto una soluzione tenue di *orange* (G), e si tratta poscia come sopra. Con questo metodo i corpi inclusi restano colorati in azzurro, i nuclei in rosso colla safranina, e il protoplasma delle cellule in giallo coll'acido picrico o coll'*orange*.

Un altro metodo, pure raccomandato da Foà, consiste nel fissare i pezzi freschi del tumore in una soluzione di sublimato (gr. 3) nel liquido di Müller (gr. 100), fatta a caldo, tenendoveli immersi per 24 ore a 37°-40° C., entro un termostato, e poscia lavandoli e facendoli indurire nell'alcool a concentrazione sempre crescente. Le sezioni si colorano come sopra. Con questo metodo i parassiti si colorano in azzurro, i nuclei in violetto e il protoplasma in giallo.

Da una comunicazione orale, fattami gentilmente dallo stesso Prof. Foà, ho appreso che le sezioni dei pezzi induriti col liquido di Flemming, trattate col metodo così detto « universale » di Kühne per i batterî nei tessuti, permettono di vedere con sollecitudine e in modo costante i corpi parassitarî inclusi nelle cellule cancerose.

Si è detto in principio che accennavamo a tali forme, designandole specialmente come oggetto di studî ulteriori, ed è perciò che ci siamo diffusi alquanto sui metodi che servono alla loro ricerca: quanto al loro significato, sebbene i reperti suesposti rendano sempre più probabile l'ipotesi della natura parassitaria del cancro,

a cui non si oppongono nè la clinica, nè l'anatomia patologica, dal lato sperimentale però non si conosce ancora alcun fatto che la comprovi definitivamente.

Anche della cosí detta *Amoeba coli* l'importanza patogenica per la genesi della dissenteria è tuttora discussa, per quanto sia stata trovata nel contenuto intestinale del crasso in molti casi della malattia.

E difatti, malgrado che Koch (1) e Kartulis (2) abbiano osservate le amebe nella dissenteria dei paesi tropicali, non solo nelle feci, ma anche nelle sezioni dell'intestino dove esistono ulceri, e nel contenuto degli ascessi epatici, consecutivi alla dissenteria, non è però dimostrato che la loro penetrazione nelle pareti dell'intestino e nel fegato sia primitiva, piuttosto che secondaria a lesioni prodotte da altri microrganismi patogeni.

Questo dubbio è confortato dal fatto che la presenza delle amebe nell'intestino è stata osservata anche in altre malattie accompagnate da diarrea, come è il tifo ed il colera, ed anche nelle persone sane (Grassi) (3); mentre d'altronde nella dissenteria epidemica si sono trovati altri microrganismi e non le amebe (4).

Senza adunque volere escludere l'importanza patogenica dell'*amoeba coli* in certe forme di dissenteria, specialmente in quella endemica dei paesi caldi ed a lento decorso, si deve ammettere però che la dissenteria, come la polmonite, anzichè essere una malattia eziologicamente unica, può essere prodotta da diverse specie di microrganismi.

Per coltivare le amebe dalle feci dissenteriche, Kartulis (5) raccomanda una decozione di paglia (30 gr. per 2 litri di acqua) filtrata, sterilizzata, e distribuita in boccette d'Erlenmeyer, nelle quali si aggiunge qualche goccia di feci dissenteriche fresche, tenendole a 37° C. senza il turacciolo d'ovatta. Dopo 24-48 ore si forma sul liquido una pellicola, che si trova composta di batterî e di giovani amebe.

(1) Koch-Gaffky, *Bericht zur Erforschung der Cholera im Iahre* 1883, pag. 65.

(2) Kartulis, *Ueber tropisch Leberabscesse und Ihr Verhältniss zur Dysenterie*, Virchow's Archiv, Vol. 118, 1889.

(3) Grassi, *Significato patologico dei protozoi parassiti dell'uomo*. Atti della R. Accademia dei Lincei, 1888.

(4) V. il lavoro riassuntivo di Wesener *Unsere gegenwärtigen Kenntnisse über Dysenterie*, Centralblatt f. allgemeine Pathologie u. pathologische Anatomie, Vol. III, 1892, pag. 484.

(5) Kartulis *Einiges über die Pathogenese der Dysenterie-Amöben*. Centralbl. f. Bacteriologie Vol. IX, 1891, pag. 365.

Veniamo ora al più importante dei protozoi parassitarî, almeno per la patologia umana, a quello, cioè, che è stato trovato nelle *febbri da malaria* e che si può ormai considerare con certezza come l'agente patogeno di tale malattia.

Sulla storia della scoperta di questo parassita, che in massima parte è gloria italiana, non possiamo entrare in molti particolari, essendoci vietato dall'indole del libro, essenzialmente tecnica; ci limitiamo perciò a toccarne i punti principali, rimandando pel resto il lettore ad alcuni lavori riassuntivi molto accurati, quali sono quelli pubblicati da Plehn (1), da Spener (2) e da Daulet (3).

Il **parassita malarico**, osservato nel sangue la prima volta da Laveran (4), venne quasi contemporaneamente studiato da Celli e Marchiafava (5), e spetta a questi il merito di avere per primi dimostrato che la forma principale del parassita, anzichè essere rappresentata dai flagelli liberi (*filaments mobiles*), o dalle forme flagellate, come ha creduto Laveran, è invece costituita dai corpi ameboidi endoglobulari, i quali invece, secondo Laveran, non sarebbero che cisti contenenti il parassita; spetta pure ad essi il merito di aver trovato che il parassita è contenuto nell'interno del globulo rosso, a spese del quale vive e si sviluppa, convertendone l'emoglobina in melanina, mentre Laveran ha detto che il parassita non è endoglobulare, ma è soltanto aderente ai globuli rossi nelle prime fasi del suo sviluppo, e di avere anche dimostrato la natura vivente di quei corpi endoglobulari e la loro importanza patogenica per la malaria, riproducendo artificialmente nell'uomo, coll'iniezione intravenosa di sangue infetto, l'infezione malarica collo stesso reperto del sangue, caratteristico dell'infezione naturale.

Dopo la scoperta di tali fatti, d'indole generale, il passo più grande nello studio della biologia del parassita malarico si deve alle ricerche di Golgi (6), il quale ha trovato che esistono parecchie

(1) Plehn, *Aetiologische und klinische Malariastudien*, Berlin 1890.

(2) Spener, *Ueber den Krankheitserreger der Malaria*, Biologisches Centralblatt 1891, pag. 390 e 423.

(3) Daulet, *Étude critique sur l'ètiologie du paludisme*, Paris, 1891.

(4) Laveran, *Traité des fièvres palustres avec la description des microbes du paludisme*, Paris 1884.

(5) Marchiafava e Celli, *Sulle alterazioni dei globuli rossi nella infezione da malaria e sulla genesi della melanemia*, Atti della R. Accademia dei Lincei, 1883-84. — *Nuove ricerche sull'infezione malarica*, Archivio per le Scienze mediche, Vol IX, pag. 311, 1886-1887. — *Studî ulteriori sull'infezione malarica*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. X, pag. 185, 1886.

(6) Golgi, *Osservazioni sul sangue dei malarici, il ciclo evolutivo dei parassiti malarici nella quartana*. Giornale della R. Accademia di medicina di Torino, 1885. — *Sull'infezione malarica*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. X, pag. 109, 1886. — *Ancora sull'infezione malarica*, Gazzetta degli Ospitali, N.° 33, 1886. — *Sul ciclo evolutivo dei parassiti malarici nella febbre terzana*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. XIII, pag. 173, 1889.

varietà o specie del parassita, che i diversi tipi classici di febbre malarica (quartana, terzana e loro combinazioni) stanno in rapporto col diverso ciclo di sviluppo del parassita corrispondente, e che i singoli accessi stanno sempre in rapporto collo sviluppo, maturazione e riproduzione di una generazione parassitaria, dando anche la soluzione del problema dell' intermittenza degli accessi febbrili malarici. Egli ha inoltre esattamente studiato e descritto il processo ciclico di sviluppo e quello di moltiplicazione (sporulazione) del parassita nel sangue, ed ha posto in sodo l'importanza del fagocitismo (globuli bianchi) nell'andamento del processo infettivo (1).

I nomi degli autori citati finora sono quelli che meritano di essere ricordati in prima linea nella storia della scoperta del parassita malarico; ma oltre a questi havvi una serie numerosa di altri osservatori, di tutti i paesi, i quali hanno in gran parte confermato e in parte anche ampliato le conoscenze sulla biologia di questo interessante microrganismo, stabilendo così sopra basi non dubbie l'importanza patogenica di esso per l'infezione malarica.

Il parassita malarico, quale ci si presenta nel sangue degli infermi, è polimorfo: esso, cioè, appare sotto forme diverse a seconda del periodo del suo sviluppo, ed a seconda del tipo febbrile a cui corrisponde. I tipi morfologici principali possono ridursi a cinque:

1. *Forme ameboidi endoglobulari senza pigmento*, che rappresentano il parassita giovane nel periodo iniziale del suo sviluppo. Tali forme sono di grandezza variabile, da $^1/_{10}$ ad un $^1/_3$ del globulo rosso, secondo il periodo del loro sviluppo ed anche secondo la varietà parassitaria a cui appartengono: la loro figura è rotondeggiante, ma cambia assai in causa del movimento vivace di cui sono dotate. Quanto alla struttura, si distingue in esse una porzione periferica, più spessa e splendente, l'*ectoplasma*, ed una interna meno splendente, talora anche finamente granulosa, l'*endoplasma*, il quale da alcuni osservatori è considerato come il *nucleo* dell'elemento cellulare. Queste forme sono dotate di movimenti ameboidi, più o meno vivaci, che impartiscono al parassita le figure più svariate (Tav. II, fig. 1 a 10).

2. *Forme pigmentate*, egualmente dotate di movimenti ameboidi, le quali si differenziano dalle prime soltanto perchè più grosse, e perchè contengono nel loro interno granuli di pigmento (melanina), sotto forma di bastoncini, o di granuli finissimi, derivanti dalla trasformazione della sostanza colorante del globulo, nel quale sono contenute. Tali forme aumentano di grossezza sempre di più, incor-

(1) Golgi, *Il fagocitismo nell'infezione malarica*, Riforma medica 1888.

porando la sostanza del globulo, finchè questo scompare totalmente o per la più gran parte, restando in tal caso come una linea di doppio contorno, incoloro, che circonda il parassita (Tav. II, fig. 11 a 15). — Le forme ameboidi, senza pigmento e pigmentate, rappresentano la fase di vegetazione semplice del parassita malarico.

3. *Forme in scissione*, che rappresentano lo stadio culminante, di maturazione, dello sviluppo del parassita. In queste manca il movimento ameboide; la loro figura è tondeggiante, e nell'interno appare poco evidente la distinzione dell'endoplasma e dell'ectoplasma. La maniera colla quale si compie la scissione, e quindi l'aspetto di tali forme, è molto varia, specialmente a seconda dei tipi febbrili a cui appartiene il parassita (Tav. II, fig. 16, 17, 18).

Ricordiamo infine che la scissione si compie per lo più nelle amebe pigmentate, ma si osserva pure talvolta in quelle senza pigmento.

4. *Forme semilunari* (o fusate, od ovali), sprovviste di movimenti ameboidi, contenenti pigmento, le quali si trovano specialmente nelle forme atipiche e lente di infezione malarica, e secondo alcuni costituiscono una fase di sviluppo di una varietà speciale di parassita (fig. 19 a 22).

5. *Forme rotonde flagellate*, le quali con molta probabilità, invece di essere la forma perfetta del parassita (Laveran), rappresentano piuttosto una fase transitoria, e forse degenerativa, di esso (fig. 25, 26). Queste forme si trovano prevalentemente in rapporto col ciclo evolutivo delle semilune, ma si possono trovare anche nelle febbri regolari (terzana e quartana) in coincidenza della fase di maturazione dei parassiti, o poco prima.

L'importanza e il significato di queste diverse forme non è egualmente interpretato dai diversi autori. Tutti son d'accordo nell'ammettere che la 1.ª fase dello sviluppo è rappresentata dalle amebe senza pigmento, la 2.ª dalle amebe pigmentate e la 3.ª dai corpi in scissione; da questi hanno origine le amebe libere, le quali penetrando nei globuli rossi ricominciano in essi il ciclo di sviluppo, dalle forme senza pigmento ai corpi in scissione.

Le opinioni sono però divergenti riguardo all'origine e al significato dei corpi flagellati e semilunari. Secondo alcuni, non tutte le amebe mature subiscono la sporulazione, ma alcune rimangono sterili, divengono libere e costituiscono le forme flagellate, oppure restano incluse nei globuli e divengono corpi semilunari (o fusati od ovali); secondo altri invece (Golgi, Canalis) i corpi semilunari costituiscono una fase costante dello sviluppo di una varietà speciale parassitaria, derivante anch'essa dalle amebe senza pigmento, e sono

capaci di andare a sporulazione, come le forme adulte delle altre varietà. Le forme rotonde e flagellate costituirebbero uno stadio di sviluppo delle forme semilunari, che non vanno a sporulazione, ma degenerano e muoiono.

Il parassita si presenta poi sotto forme alquanto diverse, e compie un ciclo speciale di sviluppo, a seconda dei tipi febbrili coi quali l'infezione si manifesta.

Noi dobbiamo perciò distinguere diverse *varietà* o *specie* di parassiti malarici, e cioè:

1.° Un parassita della febbre quartana (*Amoeba malariae febris quartanae*, Golgi), il quale compie il suo ciclo di sviluppo in tre giorni, nell'ordine seguente:

Il primo stadio è rappresentato da un corpo ameboide, senza pigmento, provvisto di nucleo, limitato da un contorno netto, tondeggiante, il quale manifesta un movimento ameboide poco vivace. Queste forme giovani si trasformano presto in corpi pigmentati, i quali crescono lentamente, senza deformare il globulo rosso e senza che questo perda il suo colore caratteristico; ciò vuol dire che la trasformazione dell'emoglobina in melanina si fa lentamente e in corrispondenza dell'accrescimento del parassita, cosicchè anche nell'ultima fase, allorquando resta del globulo soltanto una piccola zona anulare attorno al parassita, essa conserva ancora il suo colorito. Questo stadio di accrescimento progressivo endoglobulare del parassita si compie nei due giorni di apiressia.

Giunto così il parassita allo stato di maturità, nelle 6-8 ore che precedono l'accesso si svolgono le ultime fasi dello sviluppo, che mettono capo alla segmentazione: il pigmento si raccoglie, a grado a grado, nel centro, e mentre ciò avviene, nel protoplasma del parassita vanno disegnandosi linee tenuissime, che segnano il processo di scissione del corpo parassitario, risultandone la formazione di 6 a 12 corpicciuoli, rotondi od ovali, nucleati, i quali sono disposti intorno ad un ammasso centrale di pigmento, talvolta così regolarmente come i petali di una margherita attorno al talamo. Finalmente questi corpicciuoli si fanno liberi, distaccandosi dall'ammasso centrale di pigmento. Queste diverse fasi di sviluppo sono rappresentate dalla fig. 30 (*a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*) della Tav. II.

L'intiero ciclo di sviluppo ora descritto si compie in 3 giorni, ossia nel periodo che decorre fra un accesso e l'altro di quartana regolare, in modo che la comparsa delle amebe al 1.° stadio succede all'incirca nella seconda metà del primo giorno, ed i due giorni successivi sono occupati dall'accrescimento e dalla maturazione del parassita, finchè, alla fine dell'apiressia e in corrispondenza dell'i-

nizio del nuovo accesso febbrile, si compie la sporulazione e l'invasione della nuova generazione di parassiti nei globuli rossi.

Le quartane *semplici* sono determinate da una generazione unica di parassiti, che si sviluppano contemporaneamente nel periodo di tre giorni, mentre le quartane *doppie* e quelle *triplicate* (alcune forme di febbre quotidiana) sono prodotte respettivamente da due o da tre generazioni di parassiti, che maturano successivamente con un giorno d'intervallo.

2.° Un parassita della *febbre terzana* (*Amoeba malariae febris tertianae*, Golgi), il quale compie il suo ciclo di sviluppo in due giorni e con modalità diverse da quello della quartana. Qui i corpi ameboidi sono dotati di movimenti molto più vivaci, sono limitati da un contorno più netto, crescono più rapidamente e il pigmento che essi contengono è a granuli più minuti. La sostanza colorante del globulo rosso si altera più rapidamente, sia scomparendo (Golgi), e sia assumendo il colore di ottone vecchio (Bastianelli e Bignami). La sporulazione delle forme mature nella terzana non è uniforme come nella quartana, ma si effettua con diverse modalità; talora attorno a un nucleo centrale di pigmento si dispongono regolarmente 12-20 corpicciuoli rotondi, tal'altra invece, dopo che il pigmento si è radunato nel centro, la massa restante del parassita si trasforma in un ammasso irregolare di corpicciuoli tondeggianti, che alla fine divengono liberi (Tav. II, fig. 31 *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*). Tanto nella quartana, come nella terzana, ma più frequentemente in questa, non in tutte le forme mature si compie la sporulazione, ma talune di queste, divenute libere nel plasma, presto degenerano; si vacuolizzano, emettono prolungamenti e muoiono.

Quanto ai blocchi di pigmento rimasti liberi pel fatto della scissione, tanto nella quartana come nella terzana, essi vengono incorporati e distrutti, colle leggi del fagocitismo, sia dai globuli bianchi del sangue, come dalle cellule fisse del parenchima di certi organi, e specialmente del fegato e della milza (Golgi).

Il ciclo di sviluppo del parassita nella terzana si compie in due giorni, in guisa che nella 2ª metà del primo giorno (giorno dell'accesso) si manifestano le forme ameboidi, nel giorno seguente queste arrivano a maturità, e nel terzo giorno si ha, colla sporulazione e coll'invasione nei globuli dei parassiti neoformati, il nuovo accesso febbrile.

Nella terzana *semplice*, tipica, i singoli accessi febbrili sono in rapporto col ciclo evolutivo di un'unica generazione di parassiti nel sangue; nella terzana *doppia* (quotidiana) invece i due accessi, che si succedono a un giorno di distanza, corrispondono alla

maturazione e segmentazione di due diverse generazioni parassitarie, che raggiungono il completo sviluppo con un giorno di distanza.

Allorquando poi lo sviluppo di diverse generazioni parassitarie, sia della terzana come della quartana, si succede senza l'intervallo regolare di un giorno, come anche allorquando coesistono le due varietà parassitarie, si hanno forme di febbri non più tipiche ma *irregolari*, la cui natura si può però egualmente diagnosticare coll'esame attento e ripetuto del sangue.

Le leggi suesposte, scoperte da Golgi, relative al ciclo di sviluppo del parassita malarico nella febbre quartana e nella terzana e al rapporto che esiste fra gli accessi febbrili e lo sviluppo di una o più generazioni del parassita, hanno una grande importanza anche dal punto di vista pratico; giacchè l'esame del sangue ci permette di stabilire non solo il tipo di febbre, ma anche la gravità di essa, secondo il numero più o meno grande di parassiti che si riscontrano nel sangue, nonchè di prevedere l'insorgenza prossima o remota degli accessi febbrili, tenendo conto delle diverse fasi di sviluppo del parassita.

Il reperto dei parassiti malarici nel sangue, descritto finora, corrisponde adunque ai tipi febbrili della quartana, della terzana e di alcune quotidiane (terzana doppia, quartana tripla). Ma oltre a queste, sonvi anche altre forme di infezione malarica, quali il gruppo di febbri, poco regolari e a lungo decorso, che dominano nell'estate e nell'autunno nelle località dove la malaria è più intensa, febbri le quali ora hanno un carattere intermittente con lunghi intervalli (5-15 giorni), ora si trasformano in febbri perniciose, ed ora finalmente terminano coll'anemia e cachessia malarica.

In tutte queste forme d'infezione il reperto del sangue diversifica assai da quello della terzana e della quartana, ed è anche diversamente descritto ed interpretato dai diversi osservatori.

Difatti, secondo Celli e Marchiafava (1), il tipo fondamentale di tali febbri sarebbe quotidiano, con tendenza degli accessi a prolungarsi ed a ravvicinarsi, e il reperto più importante, e spesso anzi l'unico, fornito dall'esame del sangue, è costituito da parassiti ameboidi non pigmentati, piccoli (Tav. II, fig. 27), i quali crescono poco, hanno poca tendenza alla pigmentazione ed arrivano alla fase di sporulazione senza riempire totalmente il globulo rosso e senza decolorarlo completamente, talora anzi prima di addivenire pigmentati. La sporulazione si compie prevalentemente nei capillari di certi organi interni, i quali si trovano pieni di amebe senza pigmento,

(1) Celli e Marchiafava, *Sulle febbri malariche predominanti nell'estate e nell'autunno in Roma.* Archivio per le Scienze mediche, Vol. 14, pag, 177, 1889.

o pigmentate, in via di scissione (Tav. II, fig. 28 e 29). Allorquando la febbre dura a lungo, compaiono anche le forme semilunari, le quali però non sarebbero che forme accessorie e sterili del parassita.

Secondo Canalis (1), quelle febbri sono dovute ad una speciale varietà parassitaria, così detta « varietà delle semilune », appunto perchè queste costituiscono una fase costante dello sviluppo di essa, la quale compirebbe il suo ciclo evolutivo in due modi: o in modo rapido, corrispondente press'a poco al ciclo descritto da Celli e Marchiafava, oppure in modo lento, dando luogo alle forme semilunari, le quali, anzichè essere sterili, sarebbero forme mature del parassita, che si segmentano, dando luogo a nuove generazioni.

Finalmente Marchiafava e Bignami (2) distinguono in tali febbri un tipo quotidiano e un tipo terzanario, e corrispondentemente a ciò descrivono due varietà di parassita malarico, distinte da quelle della quartana e terzana, classiche.

Anche per questo gruppo di febbri, le osservazioni e gli studi di Golgi (3) hanno portato una gran luce, additando anzitutto, quale causa precipua delle incertezze e delle contradizioni esistenti fra i risultati degli osservatori precedenti, il fatto che in tali febbri, a differenza di quanto succede nelle intermittenti classiche (quartana, terzana e loro combinazioni), l'intiero processo di sviluppo dei parassiti malarici non si svolge nel sangue circolante, ma si compie invece negli organi interni, e che perciò i reperti parassitologici del sangue circolante non rappresentano altro che un indice accidentale, sebbene quasi costante, di questo gruppo speciale di febbri malariche. A questo risultato importantissimo Golgi è arrivato mediante uno studio sistematico ed accurato del sangue estratto dalla milza, in confronto di quello estratto dal dito, dimostrando in tal modo che, mentre in questo non si trova altro che le piccole amebe endoglobulari, l'esame del contenuto splenico invece fornisce costantemente, in qualunque periodo, reperto positivo, rappresentato da 3 diverse fasi di sviluppo del parassita, e cioè:

1.ª Fase, rappresentata dalle giovani amebe senza pigmento, o provviste di qualche granulo, con tutte le modificazioni descritte

(1) Canalis, *Studi sulla infezione malarica. Sulla varietà parassitaria della forma semilunare di Laveran e sulle febbri malariche che da essa dipendono.* Archivio per le scienze mediche, Vol 14, pag. 73, 1890.

(2) Marchiafava e Bignami, *Sulle febbri malariche estivo-autunnali*, Bollettino della R. Accademia medica di Roma, Fasc. V. 1892.

(3) Golgi, *Sulle febbri malariche estivo-autunnali di Roma*, Gazzetta medica di Pavia, Nov. e Dec. 1893.

dagli osservatori precedenti per le amebe circolanti nel sangue. Di queste la più notevole, specialmente perchè spesso si compie in prossimità dell'accesso, è rappresentata da quell'insieme di alterazioni, in virtù delle quali i globuli rossi e i parassiti che vi sono inclusi assumono l'aspetto dei così detti *globuli ottonati* (Marchiafava e Celli), a cui contribuisce in parte il raggrinzamento del protoplasma e in parte lo speciale colore d'oro vecchio che assume l'emoglobina. Questi globuli ottonati però talora compaiono tardivamente, ossia ad accesso già sviluppato, e talora anche non compaiono affatto (Golgi).

2.ª Fase, rappresentata da piccole amebe con blocchetto centrale di pigmento, fino alla più o meno avanzata invasione del globulo rosso.

3.ª Fase, rappresentata da parassiti, endoglobulari o liberi, diversamente modificati per l'ulteriore sviluppo, e sopratutto pei processi di riproduzione, la quale si compie con diverse modalità.

Per quanto non sia ancora completamente determinato, nelle sue modalità di tempo e di forma, il ciclo di sviluppo dei parassiti di questo gruppo di febbri malariche, tuttavia dalle osservazioni fatte finora Golgi ritiene di poter concludere con sicurezza che le amebe circolanti nel sangue nulla hanno a che fare col processo febbrile, e che questo è invece legato esclusivamente al ciclo delle amebe che compiono il loro sviluppo sempre fisse negli organi interni: non resta quindi giustificata la distinzione degli osservatori precedenti, di una quotidiana vera e di una terzana, estivo-autunnali, fatta in base all'esame ematologico.

In base alle osservazioni e ai fatti ora esposti, Golgi propone di distinguere dal punto di vista eziologico, ed anche clinico, le febbri malariche in due grandi gruppi:

1.° Gruppo di febbri intermittenti, la cui patogenesi è dovuta a parassiti che hanno sede prevalente e prevalentemente compiono il loro ciclo di sviluppo nel sangue circolante. A questo gruppo appartengono le febbri intermittenti classiche, ossia le quartane e le terzane comuni, colle loro combinazioni di quartana e terzana doppia e quartana tripla (alcune quotidiane), nonchè certe febbri irregolari, allorquando le colonie o generazioni parassitarie si succedano senza l'ordinario intervallo di un giorno. Le febbri di questo gruppo si riferiscono sicuramente a due diverse *varietà* (*o specie*) di parassiti, le quali compiono il loro sviluppo rispettivamente in tre (quartana) o in due giorni (terzana), colle modalità di forma e di tempo, già descritte. In questo primo gruppo l'esame microscopico del sangue fornisce sempre un risultato positivo in ogni pe-

riodo dell'andamento clinico, colle modificazioni caratteristiche legate alle diverse fasi di sviluppo, le quali permettono non solo di diagnosticare con sicurezza la malattia e il suo tipo, ma eziandio di presagire la prossimità o meno di un accesso febbrile, e fino ad un certo punto la sua gravità.

2.° Gruppo di febbri intermittenti, la cui patogenesi è dovuta a parassiti che hanno sede prevalente e prevalentemente compiono le fasi del loro ciclo in condizioni di relativa stabilità negli organi interni (milza e midollo delle ossa).

A questo gruppo appartengono le febbri che dominano nella stagione più calda nei paesi dove la malaria è più intensa (agro romano, maremma toscana, paludi pontine, Algeria, Caucaso, ecc.), febbri che clinicamente possono assumere tipi multiformi, di quotidiane, di bidue (Baccelli), in cui le forme termiche comprendono parte di due giorni, di irregolari, di subcontinue e subentranti, e di perniciose. Di queste febbri non è possibile per ora fare un raggruppamento basato su di una determinata biologia o ciclo di sviluppo del parassita. Trattasi però in ogni caso di generazioni parassitarie, le quali, trovandosi negli organi in diversa fase di sviluppo, a periodo abbastanza regolare, oppure con successione più o meno continuata, dànno origine a colonie di giovani forme, che possono essere immesse nel sangue in quantità grande o piccola, od anche insignificante, dando luogo al reperto ematologico delle piccole amebe endoglobulari.

In questo secondo gruppo quindi, nè è costante il reperto specifico del sangue circolante, nè le forme parassitarie che in esso si vedono presentano quella successione di fasi che è così caratteristica pel primo gruppo: oltre a ciò non vi è alcuna proporzione fissa fra il reperto ematologico e le manifestazioni generali dell'infezione, potendosi dare casi di infezione grave con reperto parassitologico del sangue scarso (e talora anche nullo addirittura), e viceversa; giacchè il parassita compie le sue fasi di sviluppo negli organi interni, dove ha sede fissa, e le forme giovani che risultano dalla sua riproduzione possono eventualmente entrare in circolazione in quantità maggiore o minore, secondo circostanze finora non determinate. Essendo anzi abbastanza frequenti i casi di forme gravi con reperto scarsissimo di amebe nel sangue, per stabilire la diagnosi di infezione malarica nei casi dubbî, occorre fare un esame accurato e ripetuto del sangue, a fine di evitare lo scambio con altre forme infettive clinicamente simili.

A questo stesso gruppo si debbono pure ascrivere, secondo Golgi, quelle febbri intermittenti, di vario tipo, legate alla presenza nel

sangue delle forme designate col nome di « semilune o corpi falciformi » (*Laverania malariae* di Grassi), sia perchè anche queste derivano dalle piccole amebe endoglobulari, sia perchè gli accessi febbrili sono sempre accompagnati dall'invasione nel sangue delle piccole amebe, e sia finalmente perchè le febbri legate alle semilune si presentano sempre come una successione di febbri, che in principio si svolsero come quotidiane o irregolari, riferibili al secondo gruppo.

Riguardo al *meccanismo d'azione* del parassita malarico, esso si compie mediante due processi distinti, uno *morfologico* e l'altro *chimico*: il primo è rappresentato dalla distruzione graduale dei globuli rossi per opera del parassita che vive e si sviluppa a spese di essi, trasformandone la sostanza colorante (emoglobina) in *melanina*; e questo ci dà ragione dell'oligocitemia e della melanemia, le quali si hanno sempre in grado più o meno elevato, secondo la gravità e la durata dell'infezione; il processo chimico invece è rappresentato dalla comparsa di un veleno, non ancora conosciuto, che si rende libero nell'atto della sporulazione del parassita e produce la febbre. La diversa gravità dell'infezione sta in rapporto colla diversa quantità dei parassiti, ed anche, verosimilmente, col diverso grado di virulenza che essi posseggono.

Tenendo conto delle leggi di sviluppo da lui scoperte, e già esposte a proposito delle febbri intermittenti classiche, Golgi ha potuto anche fornire una spiegazione facile e naturale del fenomeno dell'*intermittenza*, la quale è soltanto in rapporto colla durata del periodo di accrescimento endoglobulare del parassita, periodo che varia nelle diverse varietà (o specie) dello stesso, come si è detto. Il ciclo di sviluppo del microparassita si compie nel tempo che decorre dall'insorgenza di un accesso all'insorgenza di un accesso vicino: l'accesso febbrile è sempre in corrispondenza colla fase riproduttiva (sporulazione) del parassita, ed è verosimilmente causato da sostanze chimiche che si rendono libere, capaci di spiegare azione pirogena, e la nuova generazione parassitaria, la quale invade, almeno in parte, nuovi globuli rossi, crescendo a spese della sostanza di questi, esercita per tutto il periodo di sviluppo endoglobulare un'azione limitata ai globuli rossi, senza disturbare lo stato generale dell'organismo, come succede precisamente durante il periodo dell'apiressia.

La *distruzione* dei parassiti malarici nel sangue avviene sia sotto forma di degenerazione spontanea delle forme che non arrivano alla sporulazione, e sia sotto forma di distruzione per opera dei fagociti, come ha dimostrato specialmente Golgi, il quale ha

stabilito che nello svolgimento del processo infettivo malarico il fagocitismo rappresenta una parte caratteristica e costante, compientesi come regolare funzione periodica dei globuli bianchi in corrispondenza di determinate fasi del ciclo di sviluppo dei parassiti malarici, e in un determinato periodo del processo febbrile.

Secondo tali osservazioni nelle febbri periodiche regolari (terzana, quartana) non si trovano forme fagocitarie nel sangue circolante, finchè i parassiti sono nel loro stadio endoglobulare e nelle fasi che precedono la perfetta maturazione: il periodo in cui, esaminando il sangue circolante, si possono sorprendere in questo le manifestazioni del fagocitismo, comincia coll'insorgere dell'accesso e apparisce più evidente 3-4 ore dopo: in questo periodo si trovano globuli bianchi, contenenti parassiti malarici in via di segmentazione o già disgregati (*leucociti plasmodiferi*), o masse isolate di pigmento rimaste libere dopo la sporulazione (leucociti *melaniferi*) (Tav. II. fig. 32 *a*, *b*, *c*). Nelle ore successive, invece, si trovano leucociti, contenenti le stesse forme in stato di disgregazione più avanzata, fino a ridursi allo stato di granuli finissimi di pigmento; finchè, dopo 10-12 ore, le forme fagocitarie scompaiono, per ricomparire colle stesse modalità nell'accesso successivo.

Nel gruppo delle febbri estivo-autunnali la comparsa del pigmento, o dei globuli pigmentiferi, nel sangue circolante ha luogo in apparenza senza leggi determinate, presentandosi quegli elementi ora scarsi ed ora abbondanti, senza che si possa dire con certezza da che dipendano siffatte oscillazioni. Esaminando però il materiale splenico, Golgi ha potuto verificare che, a differenza di quanto avviene nelle intermittenti classiche del 1.° gruppo, in quelle estivo-autunnali si trova in qualsiasi periodo nella milza e nel midollo delle ossa un numero grande, talora veramente enorme di cellule contenenti i parassiti malarici in tutte le fasi del loro sviluppo, dalle piccole amebe endoglobulari alle forme di sviluppo più avanzato, comprese le fasi riproduttive. I parassiti inclusi sono talvolta in quantità così grande, da risultarne l'imagine di vere forme cistiche. Ma ciò che più interessa si è che i parassiti inclusi, se talvolta presentano i segni di un processo distruttivo da cui sono invasi, spesso invece si presentano perfettamente conservati e coll'aspetto di forme che accennano a sviluppo progressivo, mentre invece non di rado le cellule includenti presentano segni di degenerazione (1).

Basandosi anzi su questi fatti Golgi emette l'ipotesi, che i pa-

(1) Bastianelli. *I leucociti nell'infezione malarica*, Bollettino dell'Accad. med di Roma, 1892, pag. 6.

rassiti estivo-autunnali, inglobati dalle cellule spleniche e midollari, anzichè morire, trovino in queste condizioni adatte per vivere e per svilupparsi, verificandosi così un vero ciclo di sviluppo endocellulare. Con ciò si spiegherebbe la singolare resistenza che offrono tali febbri all'azione della chinina, nonchè la facilità di recidiva che esse presentano, e che costituisce anch'essa una caratteristica clinica di questo gruppo di febbri.

Il fatto della distruzione fagocitaria, insieme con quello della degenerazione spontanea a cui può soggiacere il parassita, ci spiega in parte come nei successivi accessi l'infezione non si aggravi sempre di più, come dovrebbe accadere se tutti i parassiti giovani andassero a maturazione, in modo che tutte le forme giovani derivanti dalla loro sporulazione, invadessero altrettanti globuli rossi, per quivi ricominciare il loro ciclo. Il fagocitismo e la degenerazione non solo provvedono alla distruzione di un certo numero di parassiti nei singoli accessi, ma possono anche influire sullo spontaneo estinguersi dell'infezione, che pur si verifica non tanto raramente.

Riguardo al modo con cui eseguire l'*esame del sangue* per la ricerca e per lo studio dei parassiti malarici, diciamo anzitutto che il sangue si estrae, mediante puntura, generalmente dal dito o dal lobulo dell'orecchio, previa pulitura accurata della superficie cutanea coi soliti mezzi; oppure si estrae dalla milza, il che riesce utile specialmente perchè, come si è detto, alcune varietà del parassita vivono e si sviluppano negli organi interni, a preferenza che nel sangue circolante. Plehn consiglia, oltre che nettare la pelle, di ricoprire anche la punta del dito con vaselina pura, per impedire che il sangue fuoruscente, andando a contatto della cute, si possa in qualche modo inquinare.

Il metodo migliore, ed anche più semplice, per l'esame del sangue malarico è quello di osservare il sangue *fresco*, senza l'impiego di nessun reagente. Il sangue deve essere disteso in strato molto sottile fra il coproggetti e il portoggetti; e ciò si ottiene deponendo su di un coproggetti una piccola goccia di sangue, capovolgendola su di un portoggetti, ed esercitando coll'unghia di un dito una leggera compressione sul coproggetti, facendo il tutto rapidamente, per ottenere l'uniforme distribuzione dello straterello di sangue ed impedire che i globuli rossi si riuniscano a pile e si raggrinzino. L'osservazione microscopica di tali preparati deve farsi immediata, circondando semplicemente i margini del coproggetti con uno straterello di paraffina, per impedire l'evaporazione e il disseccamento del sangue. In tal guisa, osservando con un obbiettivo ad

immersione, si riesce a vedere distintamente le particolarità di struttura delle diverse forme di parassiti ed i loro movimenti, anche alla temperatura dell' ambiente. Perchè però il movimento delle amebe si conservi più a lungo, val meglio tenere il preparato sul tavolino riscaldante. L'osservazione del sangue fresco dev'essere fatta a luce moderata, perchè illuminando soverchiamente il preparato, restano visibili i vacuoli che si scorgono anche normalmente in alcuni globuli rossi, mentre si perdono di vista le forme ameboidi dei parassiti.

Si può anche colorare il sangue fresco, senza alterarne gli elementi e senza uccidere i parassiti che contiene, applicando il metodo proposto da Celli e Guarnieri (1), secondo il quale si mescola il sangue deposto sul portoggetti con una goccia di soluzione di azzurro di metilene nel siero ascitico sterile, e si ricopre col coproggetti, lasciandolo per 1-2 ore in una camera umida, perchè si compia la colorazione dei parassiti malarici.

Per allestire preparati da conservare a secco, bisogna anzitutto distendere rapidamente la gocciolina di sangue in strato sottilissimo sul coproggetti con una bacchetta di vetro, oppure col metodo dello strisciamento di due coproggetti compressi l'un contro l'altro, farlo essiccare all'aria, o entro un essiccatoio, e fissarlo. Per operare il fissamento, meglio che il calore della fiamma, vale l'immersione del vetrino in una miscela a parti eguali di alcool e di etere, per mezz'ora, oppure l' immersione per 24 ore nel cloroformio: si può anche adoperare con vantaggio il metodo di Ehrlich del riscaldamento a 110-120° C. in una stufa, specialmente per l' osservazione dei leucociti. I preparati, essiccati e fissati, si colorano bene anche colla semplice soluzione alcoolica concentrata di azzurro di metilene, tenendoveli immersi per qualche minuto, e lavandoli poscia con acqua: in tal modo i nuclei dei leucociti restano colorati in azzurro oscuro, i parassiti in azzurro chiaro e i globuli rossi leggermente in verde. Si può anche dare a questi preparati una colorazione doppia, trattandoli coll'ematossilina di Ehrlich e coll'eosina, oppure coll'azzurro di metilene ed eosina. Plehn raccomanda il miscuglio di 60 cc. di soluzione concentrata d'azzurro di metilene, 20 cc. di soluzione $^1/_2$ % di eosina nell'alcool al 75 %, 40 cc. di acqua distillata e 12 goccie di soluzione di potassa al 2 %.

Per ottenere una colorazione distinta del nucleo delle amebe, Grassi e Feletti (2) raccomandano i metodi seguenti:

(1) Celli e Guarnieri, *Sull'etiologia dell'infezione malarica*, Annali di agricoltura, 1889.

(2) Grassi e Feletti, *Weiteres zur Malariafrage*, Centralblatt f. Bakteriologie Vol. X, 1891, pag. 519.

1.° Il vetrino col sangue disseccato all'aria si fissa in un miscuglio a parti uguali di alcool e di etere, a cui si è aggiunta qualche goccia d'acido acetico, e si colora coll'ematossilina.

2.° Si depone sul portoggetti una goccia di soluzione acquosa, tenue, d'azzurro di metilene e di fucsina, e vi si capovolge sopra il coproggetti sul quale si è deposta una piccola goccia di sangue.

Da quanto sopra fu esposto chiaro risulta come una serie di importanti problemi riguardanti l'infezione malarica sono stati felicemente risolti mediante gli studì fatti in questi ultimi tempi; ma con tutto ciò restano ancora nell'eziologia della malaria alcuni punti oscuri, e fra questi principalmente il modo e la via che tengono i parassiti per penetrare nel nostro organismo e il luogo in cui si trovano nel mondo esterno. Noi possiamo ragionevolmente supporre che essi penetrano per la via degli organi respiratorì, anzichè per quella degli organi digerenti, giacchè vediamo che basta talvolta semplicemente passare attraverso una regione malarica, senza fermarvisi, per prendere l'infezione; ma fino a che non sappiamo dove vivono e si sviluppano quei parassiti nel mondo esterno, sarà assai difficile di potere stabilire con certezza con qual mezzo e per qual via arrivano ad infettare il nostro organismo.

Noi possiamo anche qui in via di probabilità ammettere, tenendo conto anzitutto del carattere puramente endemico della malaria, che l'agente specifico di essa si trovi nel terreno, ma le ricerche fatte finora per dare una prova sicura di ciò sono tutte riuscite infruttuose. Si sono invece trovati parassiti analoghi, a sviluppo endoglobulare, in molte altre specie animali, anche in quelli a sangue caldo; e tali parassiti sono stati accuratamente studiati specialmente per opera di Danilewsky (1), di Pfeiffer (2), di Kruse (3), di Grassi e Feletti (4) e di Celli e Sanfelice (5).

Di tutti quelli però osservati negli animali, havvene uno solo, trovato da Danilewsky (6) nel sangue di alcuni uccelli provenienti da regioni malariche, il quale produce una malattia accom-

(1) Danilewsky, *La parasitologie comparée du sang*, Kharkoff 1889. — *Parasites malariques dans le sang des oiseaux*, Annales Pasteur 1890, pag. 427. — *Sur les microbes de l'infection malarique aigüe et chroniques chez les oiseaux et chez l'homme*, Annales Pasteur 1890, pag. 753.

(2) Pfeiffer, *Die Protozoen als Krankheitserreger*, Jena 1891.

(3) Kruse, *Ueber Blutparasiten*. Virchow's Archiv, Vol. 120, pag. 543 e Vol. 121, pag. 359.

(4) Grassi e Feletti, *Malariaparasiten in den Vögeln*, Centralblatt für Bacteriologie, Vol. IX, 1891, pag. 403-429-461.

(5) Celli e Sanfelice, *Sui parassiti del globulo rosso nell'uomo e negli animali*, Annali dell'Istituto d'igiene di Roma, 1891, pag. 33.

(6) Danilewsky, *Contribution à l'étude de la microbiose malarique*, Annales Pasteur, 1891, pag. 759.

pagnata da febbre, a decorso ora acuto, ora cronico, che può essere paragonata alla malaria dell'uomo. Secondo Danilewsky, anzi, il reperto microscopico del sangue è anche negli uccelli diverso nella forma cronica e in quella acuta del male, e le forme parassitarie che si osservano in ambo i casi sono tanto simili a quelle che si trovano nell'uomo, nei casi corrispondenti, che egli non esita a concludere che si tratti di un unico parassita, che egli distingue col nome di *Polimitus malariæ*, coll'aggiunta di *avium*, od *hominis* (1), secondo il caso.

Una tale conclusione però è, almeno per ora, da dichiararsi prematura, giacchè le esperienze fatte hanno dimostrato che il sangue dell'uomo malarico non è capace, inoculato nelle vene, di infettare gli animali, a qualunque specie essi appartengano, e tanto meno quello degli uccelli infetti è adatto a riprodurre nell'uomo lo sviluppo dei parassiti che contiene, e l'infezione (2).

Alle lacune sovraccennate, esistenti ancora nello studio dell'eziologia dell'infezione malarica, dobbiamo aggiungere il fatto, che non è riuscito finora ad alcuno di coltivare i parassiti malarici al di fuori dell'organismo umano, e di riprodurre con essi artificialmente l'infezione.

Con tutto ciò, non possiamo ormai più dubitare che le amebe trovate nel sangue rappresentino realmente l'agente specifico della malaria, essendovi una serie numerosa di fatti, positivamente accertati coll'osservazione e coll'esperienza, che lo dimostrano.

Uno dei primi e dei più importanti è rappresentato dalla presenza costante delle forme parassitarie descritte, in tutti i casi di infezione malarica, e dalla loro mancanza assoluta nell'uomo normale e in tutti i casi di altre malattie. Da ciò deriva la importanza grande che ha il reperto dei parassiti nel sangue per la diagnosi della malattia, ed anche per la cura, specialmente nei casi d'infezione grave (perniciose), nei quali è di somma urgenza lo intraprendere presto la cura specifica coi sali di chinina.

Ricordiamo inoltre di nuovo il rapporto costante che esiste fra il ciclo di sviluppo delle amebe e il decorso dell'infezione nelle febbri intermittenti classiche, e finalmente il fatto della riproduzione del tipo febbrile e della forma parassitaria, collo stesso ciclo di sviluppo endoglobulare caratteristico, che si può ottenere nell'uomo sano, mediante l'innesto endovenoso di sangue malarico, contenente quella certa forma di parassita (3).

(1) Danilewsky, *Ueber den Polymitus malariae*, Centralblatt f. Bacteriologie Vol. IX, 1891, pag. 397.

(2) Di Mattei, *Contributo allo studio dell'infezione malarica sperimentale*, Riforma medica N.° 121, 1891.

(3) Gualdi e Antolisei, *Una quartana sperimentale*, Riforma medica 1889. N.° 264.

Notiamo a questo proposito che, se in alcuni casi non si è ottenuta la riproduzione dello stesso tipo febbrile, ciò si spiega probabilmente coll'esistenza nel sangue infetto non di una sola, ma di parecchie varietà del parassita malarico, come si osserva assai di frequente, delle quali l'una può svilupparsi a preferenza dell'altra, oppure anche nello stesso tempo, a seconda dei casi, facendo così variare il tipo febbrile.

Abbiamo insistito alquanto sulla questione dell'importanza patogenica dell'emoparassita malarico, perchè non è mancato chi ha voluto negare ad esso qualsiasi valore, appoggiandosi alcuni sulla pretesa esistenza di un bacillo specifico della malaria (1), ed altri su certe alterazioni di struttura che talora presentano i globuli rossi del sangue, e che si credettero uguali a quelle dei globuli contenenti il parassita malarico (2).

Accenniamo però appena a queste obbiezioni, giacchè l'una e l'altra sono state dimostrate prive di qualsiasi fondamento, per opera specialmente delle osservazioni di Marchiafava e Celli (3), di Golgi e de' suoi assistenti (4).

Citiamo finalmente un altro fatto, il quale, per quanto in maniera indiretta, viene anch'esso ad appoggiare l' importanza patogenica delle forme parassitarie endoglobulari nella malaria, ed è l'azione distruggitrice che su quelle forme esercitano i sali di chinina, i quali sono pure tanto efficaci per combattere l'infezione.

E qui giova ricordare che non tutte le varietà, o specie, del parassita risentono egualmente l' azione della chinina, ed anzi alcune di esse, le semilunari, e in genere quelle del gruppo estivo-autunnale, si mostrano assai resistenti alla sua azione. Varia poi il grado di resistenza del parassita al medicamento anche, e specialmente, secondo lo stadio di sviluppo in cui si trova: questo fatto si è potuto verificare specialmente pei parassiti della quartana e della terzana, i quali risentono con maggiore rapidità ed inten-

(1) Tommasi-Crudeli, *Sopra un bacillo trovato nelle atmosfere malariche dei dintorni di Pola* (Istria) *e sul « Plasmodium malariae » di Marchiafava, Celli e Golgi*, Rend. della R. Accad. dei Lincei. Seduta del 4 Aprile, 2 Maggio e 5 Dic. 1886. — Schiavuzzi, *Untersuchungen über die Malaria in Pola*, Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1888.

(2) Mosso. *Sulla fisiologia e sulla patologia del sangue*, Rend. della R. Accad. dei Lincei, Vol. 3, Fasc. 7-8, 1.°Sem. 1887. — Maragliano, *Sulla resistenza dei globuli rossi del sangue*, Nota comunicata alla R. Accad. med. di Genova, il 27 Giugno 1887.

(3) Marchiafava e Celli, *Sui rapporti fra le alterazioni del sangue introdotto nel cavo peritoneale degli uccelli e quella del sangue dell'uomo nell'infezione malarica*, Bullettino della R. Accademia medica di Roma, 1886-87, Fasc. VII.

(4) Golgi, *Intorno al preteso « Bacillus malariae » di Klebs, Tommasi-Crudeli e Schiavuzzi*, Archivio per le Scienze mediche, Vol. XIII, 1889. — Cattaneo e Monti. *Alterazioni degenerative dei corpuscoli rossi del sangue e alterazioni malariche dei medesimi*, Archivio per le scienze mediche Vol. XII, 1888.

sità l'azione della chinina, allorquando si trovano nello stadio di forme giovani, immediatamente derivanti dal processo di sporulazione; queste infatti, sorprese nel loro stato nascente, vengono sicuramente uccise dal rimedio che circola nel sangue. Dopo di queste vengono le forme di sviluppo più avanzato, prossime alla maturazione, e in terza linea le forme giovani endoglobulari, le quali risentono meno di tutte le altre l'azione della chinina, forse perchè protette da un grosso strato di sostanza globulare. La constatazione di questa legge appare evidente specialmente in quei casi, nei quali esistono contemporaneamente nel sangue parecchie generazioni parassitarie, verificandosi non di rado il caso di vedere, in seguito a dosi deboli di chinina somministrate qualche ora prima dell'accesso, trasformarsi una quartana triplice in quartana *doppia* o in quartana *semplice* (1).

Da ciò segue il precetto pratico di somministrare la chinina poche ore (3-5) prima dell'accesso: giacchè in tal modo, se non si impedisce il vicino accesso, poichè la chinina non vale ad arrestare il processo di maturazione e sporulazione che in allora compiono i parassiti, si riesce però spesso ad estinguere l'infezione; e ciò perchè in condizioni siffatte la chinina spiega la sua massima azione sulla nuova generazione parassitaria, derivante dalla sporulazione, la quale, se la dose del rimedio che si trova in circolo è sufficiente, viene in tal guisa completamente distrutta.

Quanto all'influenza che può avere il *fagocitismo* nella guarigione della malaria ottenuta colla chinina, dalle osservazioni fatte finora sembra risultare che i globuli bianchi non hanno parte attiva nell'uccisione dei parassiti malarici, non essendosi osservato sotto l'azione della chinina alcun aumento dei fenomeni fagocitarî, e che invece l'azione fagocitaria dei leucociti entra in scena dopo l'uccisione dei parassiti, essendosi talvolta verificato un qualche ritardo nella comparsa dei fagociti.

(1) Golgi. *Azione della chinina sui parassiti malarici e sui corrispondenti accessi febbrili*, Rendiconti dell'Istituto lombardo Vol. 25, Fasc. III e V, 1892.

INDICE ALFABETICO

Abbe (Apparecchio illuminatore di), 76.
Aberrazione cromatica, 75.
» sferica, 75.
Achorion Schönleinii, 169, 439.
Acidi, 178.
» (Attenuazione coi mezzi), 36.
» grassi, 24.
Acido acetico, 20.
» borico, 70.
» butirrico, 20.
» cromico, 181.
» fenico, 69.
» lattico, 20.
» osmico, 181.
» ossalico, 20.
» picrico, 131, 161.
» propionico, 20.
» solfidrico, 20, 24.
» tartarico, 20.
Acqua (Analisi batteriologica dell'), 283.
» d'anilina, 134.
Actinomyces, 167, 432.
Aerobî (Batterî), 19.
Agar. 209.
» Gelatina, 213.
Agaricus melleus, 22.
Aghi di platino, 117, 235.
Alcali, 178.
Alcaloidi, 20, 26.
Alcool, 181, 187.
» etilico, 20.
Aldiber, 276.
Alessine, 53.
Ali-Cohen, 233, 394.
Allume, 181.
Alvarez, 372.
Ammoniaca, 20, 24.
Amoeba coli, 445.
» malariae febris tertianae, 450.
» » » quartanae, 449.
Anaerobî (Batterî), 19.
Anidride carbonica (Azione sui batterî dell'), 62.
Anidride solforosa, 72.
Anilina (Acqua di), 134.
» (Colori di), 130.
Antisepsi, 63.
Antisettici, 63.
Antitossica (Azione del siero), 55.
Antitossina del tetano, 55.
Antolisei, 460.
Antracina, 306.
Apertura numerica (Degli obbiettivi), 75.
Apocromatici (Obbiettivi), 74.
Apostoli, 57.
Apparecchio livellatore e refrigerante, 222.
» » (Per l'agar), 228.
» sterilizzatore a vapor d'acqua di Koch, 95.
» sterilizzatore a vapor d'acqua di Budenberg, 96.
» di Koch per sterilizzare il siero, 100, 101.
» per solidificare il siero e l'albumina, 102.
Aria (Analisi batteriologica dell'), 269.
Arloing, 36, 56, 313.
Armanni, 324, 325, 383.
Arning, 346.
Artrospore, 9, 14,
Ascomiceti, 22.
Aspergillus flavescens, 438.
» fumigatus, 438.
» niger, 50.
Asporigeni (Batterî), 14.
Assoluti (Parassiti), 28.
Attenuazione, 33.
» mediante agenti chimici, 36.
» » » fisici, 34.
» » la luce solare, 36.
» » il riscaldamento, 36.
Autoclave (Di Chamberland), 98.
Azione antitossica, 55.
» disinfettante (Metodi d'esperimento), 67, 68.
Azione patogenica (Locale e generale), 28, 29, 30.
Azzurro di dahlia, 73.
» di metilene, 131, 132, 135.

Babes, 351, 396.
Baccelli, 454.
Bacilli, 6.
B. butyricus, 9, 15, 17.
B. coli, 361, 383, 387.
Bacillo del carbonchio, 30-37, 45, 50-61, 65-67, 69, 70-72, 301.
» del carbonchio sintomatico, 36, 45, 313,
» del colera asiatico, 19, 31, 60, 63, 64, 66, 70-72, 167, 389.
» del colèra dei polli, 40, 46, 50 ,382.

Bacillo della difterite (Löffler), 28, 34, 38 64, 66, 70, 352.
» dell'edema maligno, 16, 24, 45, 310.
» dell'influenza, 372.
» della lebbra, 34, 162, 342.
» del mal rosso dei suini, 34, 45, 50, 381.
» della morva, 34, 66, 70, 71, 72, 348.
» delle patate, 60.
» del rinoscleroma, 383.
» della setticemia dei conigli, 37, 383.
» » » » topi, 37, 40, 381.
» » emorragica, 382.
» » sifilide (Lustgarten), 31, 165, 371.
» del tetano 15, 24, 28, 31, 72, 316.
» del tifo addominale, 19, 31, 60, 64, 66, 70, 71, 72, 163, 359.
» della tubercolosi, 31, 59, 60, 71, 135, 324.
» fluorescente, 11.
» napolitano, 359.
» piocianeo, 45, 46, 341, 378.
» piogeno fetido, 389.
» prodigioso, 11, 341.
» pseudodifterico, 359.
B. epidermidis, 15.
B. mesentericus vulgatus, 318.
Bacterium photometricum, 57.
Baginsky, 354.
Banchette di vetro, 120.
Bang, 334, 339.
Banti, 384, 421.
Barbone buffalino, 383.
Barclay, 345.
Baquis, 319.
Basi tossiche, 25, 27.
Basidiomiceti, 22.
Bassini, 442.
Bastianelli, 450, 455.
Batterî artrosporiacei, 7.
» endosporiacei, 7.
» cromogeni, 20, 57.
» fotogeni, 20.
» della putrefazione, 20.
» patogeni, 20.
Baucel, 22.
Baumgarten, 51, 162, 163, 188, 258, 324, 325, 330, 340, 343, 348, 365, 369, 385.
Béchamp, 2.
Beck, 373.
Becker, 86.
Beggiatoe, 4.
Behring, 14, 37, 38, 46, 53, 55, 65, 70, 71, 72, 303, 306, 308, 322, 323.
Belfanti, 317, 369.
Bergmann, 26.
Bert, 58.
Beumer, 320.
Beyerinck, 208.
Biffi, 324.
Bignami, 450, 452.
Billroth, 3, 8, 127.
Biossido d'azoto, 63.
Biondi, 193.
Birch-Hirschfeld, 335.
Bitter, 50, 107.
Bizzozero, 8, 88, 128, 130, 168.
Bleisch, 395, 408.
Blücher, 249.
Blunt, 56, 57.
Boccette d'Erlenmeyer, 11
» di Miquel, 119.
Boer, 348, 358.
Böhmer, 128.
Boinet, 345.
Bollinger, 301, 313, 334, 432.
Bolton, 201.
Bombicci, 376, 377.
Bonome, 45, 46, 324, 430.
Bordoni-Uffreduzzi, 344, 369, 384, 3 416, 421.
Boström, 435.
Botkin, 246.
Bouchard, 46, 307, 380.
Braatz, 240, 251.
Brass, 168.
Brauell, 301.
Brefeld, 15, 17.
Brieger, 26, 27, 306, 313, 321, 356, 357, 365, 398.
Brodo nutritivo, 196.
» alcalino di Löffler, 197.
Bromo (Vapori di), 72.
Bruce, 258.
Brunner, 431.
Bruno di Bismarck, 131, 132.
Bruschettini, 365, 372, 378.
Buchner, 3, 4, 28, 30, 47, 52, 53, 242, 262, 263, 309, 341, 360, 400, 426.
Budenberg, 96.
Bujwid, 296, 393, 408.
Bumm, 217, 423.

Cadaverina, 26.
Cadeac, 72.
Cagniard-Latour, 268.
Cahen, 208.
Calore secco (Sterilizzazione col), 93.
» umido (Sterilizzazione col), 95.
Camere umide (Per culture), 118.
Campana, 345.
Canali, 434.
Canalis, 448, 452.
Caneva, 383.
Canon, 372.
Cantani, 338.
Capsula, 9.
Caput Medusae, 306.
Carbonchio (Bacillo del), 301.
Carbonchio sintomatico (Bacillo del), 313.
Carbonchiose (Vaccinazioni), 41.
Carbonati alcalini, 71.
Carbone, 369, 422.
Carle, 316.
Carmino, 129.
» e allume, 130.
Caseasi, 25.
Cattani, 55, 317, 318, 321, 322, 396, 397, 402.
Celli, 168, 337, 396, 446, 451, 458.
Celloidina (Inclusione in), 88, 90.
Cellule anfofile, 187.
» basofile, 187.

Cellule cancerose, 443.
» eosinofile, 186.
» granulose (Mastzellen) 143, 170.
» neutrofile, 187.
Cesaris-Demel, 366.
Cestine (di fil di ferro), 120.
Chamberland, 217, 303, 307, 313.
Chantemesse, 362, 365, 367.
Charrin, 45, 47, 379.
Chemiotassi, 52, 233.
Chenzinsky, 167.
Chiari, 433.
Chionyphe (Carter), 442.
Cianina, 73.
Ciglia, 11.
» (Colorazione delle), 12, 136, 138.
Cladotricee, 4.
Classificazione (Dei microrganismi) di Cohn, 3.
Cloro, 72.
Cloroformio, 72, 178.
Cloruro di calce, 72.
Clostridium, 15.
Coccotrix, 343.
Cohn, 1, 2, 3, 6, 15, 21, 57, 195.
Cohnheim, 258, 325.
Colèra (Bacillo del), 167, 389.
» nostrano, 33.
» dei polli, 382.
» dei suini, 381, 383.
Colorazione (Dei batterî in generale), 125.
» dei preparati sui coproggetti 141, 182.
» delle sezioni, 138.
» delle ciglia, 12, 147.
» delle capsule, 151.
» nucleare, 126, 129.
Colori d'anilina, 130.
» » acidi, 131.
» » basici, 131.
Colzi, 369.
Conservazione dei preparati, 184.
Cormont, 342.
Cornet, 328, 332.
Cornevin, 313.
Cott, 313.
Culture artificiali, 194.
» anaerobiche, 239.
» arrotolate, 228.
» isolanti, 220.
» piane, 223.
Czaplewski, 238, 360.

Dahmen, 392, 405.
Danilewsky, 186, 489.
D'Arsonval, 107, 108, 109, 111.
Daubet, 446.
Davaine, 2, 301.
De-Bary, 1, 7, 15, 118.
Dechamps, 363.
De-Giacomi, 166, 276.
De-Giaxa, 414.
Deneke, 392, 407, 414.
Deodoranti, 70.
Detritus granulari, 170.
Deycke, 405.
Diaframma ad iride, 78.
Diarrea estiva, 33.
Diatroptoff, 309.
Difterite (Bacillo della), 352.
» (Vaccinazioni), 46.
» (Immunità), 55.
Di Mattei, 460.
Dimetilamina, 26.
Diplococchi, 10, 13.
Diplococco pneumonico (Fränkel), 33, 383, 416,
Disinfettanti, 63.
» gassosi, 72.
Disposizione individuale, 37.
Disseccamento (Dei preparati), 180.
» (Attenuazione mediante il), 36.
» (Azione del), 61.
Distanza focale, 74.
Dönitz, 340.
Doutrelepont, 166, 372.
Dowdeswell, 391.
Downes, 56, 57.
Doyen, 402.
Dubarry, 371.
Duclaux, 24, 36, 56, 238.
Ducrey, 345.
Dunbar, 361, 364, 388, 408.
Duncker, 167, 434.
Dunham, 393.
Duval, 391.

Eberth, 127, 161, 342, 359, 368, 383.
Edema maligno (Bacillo dell'), 310.
Edington, 214.
Ehremberg, 2, 11.
Ehrlich, 49, 125, 126, 130, 134, 170, 180, 186, 313.
Eiselsberg, 431.
Elettricità (Azione dell') 57.
Ematossilina, 127,
Emmerich, 45, 307, 389, 410, 422.
Engelmann, 1, 57.
Enzimi, 104.
Eosina, 131.
Eppinger, 438.
Erba, 396.
Ernst, 368.
Escherich, 359, 366, 387.
Esmarch, 66, 67, 99, 200, 213, 228, 241, 394.
Estratti di carne, 207.
Etere, 178.

Faber, 321.
Facoltativi (Anaerobi), 19.
» (Parassiti), 29.
Fagocitismo, 50, 462.
Fahrenholtz, 51.
Farcino. V. morva.
Farcino del bue, 437.
Febbri da malaria (Classificazione delle), 453.
Febbre ricorrente (Spirillo della) 415.
Feci (Disinfezione delle) 67, 70, 71, 72.
Fehleisen, 424.
Feletti, 458.
Fenolo, 20.

Fermentazione, 23.
Fermenti, 24, 25.
Ferran, 391, 412.
Ferrati, 388.
Feser, 313.
Filaments mobiles (Laveran), 446.
Filtri, 104.
Filtro Chamberland, 104.
» Nordtmeyer-Berkefeld, 107.
Finkelnburg, 292.
Finkelnstein, 408.
Finkler, 392, 401, 414.
Fischer, 22, 59, 408.
Fischl, 192.
Fissamento (Dei preparati col calore), 179.
Flogosina, 428.
Florizina, 349.
Flügge, 3, 34, 49, 67, 278, 348.
Fluoresceina, 131, 140.
Foà, 45, 46, 369, 416.
Fodor, 8, 54, 59.
Fokker, 407.
Forster, 22, 338.
Forstetter, 277.
Fosforescenti (Batteri), 20, 21, 22, 59.
Fosforescenza, 21.
Fotogeni. V. Fosforescenti.
Foth, 351.
Fowitzky, 422.
Francotte, 89.
Frank, 309, 440.
Fränkel, 27, 62, 67, 69, 70, 85, 99, 115, 134, 166, 242, 297, 299, 306, 321, 356, 357, 359, 365, 369, 383, 396, 398, 399, 416, 426.
Frankland, 63, 279.
Freymuth, 410.
Frick, 379.
Friedländer, 127, 307, 341, 383. 385, 416.
Friedrich, 396.
Frisch, 384.
Fruttificazione (Per spore), 13.
Fuchs, 249.
Fucsina, 131, 135.
Fulmicotone, 269.

Gabritschewsky, 402.
Gadinina, 27.
Gaffky, 95, 261, 266, 310, 359, 383, 389, 396.
Gaillard, 56.
Galtier, 280, 334, 338.
Gamaleia, 47, 331, 407, 414.
Garré, 30, 190, 427.
Gärtner, 335.
Gas (Azione dei), 62.
Gasperini, 436.
Gasser, 264.
Gauthier, 26.
Geisler, 57.
Gelatina nutritiva, 202.
Gelatine colorate, 208.
Geppert, 64.
Gessard, 379.
Ghou, 423.
Giacosa, 8.
Gianturco, 343, 345.
Giesbrecht, 89, 90.
Gilbert, 365.
Girode, 365.
Globig, 59, 60, 100, 102, 201.
Globuli ottonati, 453.
Goccie pendenti, 118, 177.
Golgi, 446, 448, 450, 451, 452, 453, 455, 456, 461.
Gonococco (Neisser), 31, 166, 422.
Gorini, 395.
Gosio, 191.
Gottstein, 57, 160.
Gram (Metodo di), 127, 135, 139, 141.
Grancher, 363.
Grandine, 288.
Grassi, 397, 445, 458.
Grawitz, 429, 441, 455.
Griffini, 118.
Gruber, 228, 244, 391, 398, 400, 408.
Gualdi, 460.
Guareschi, 26.
Guarneri, 168, 337, 458.
Gunning, 233.
Gunther, 133, 137, 143, 185, 191, 201, 407.

Haeckel, 1.
Haffkine, 412.
Hallier, 118.
Hanau, 434.
Hankin, 306, 307.
Hansen, 342, 344.
Hasterlik, 412.
Hauser, 5, 14, 384.
Heider, 408.
Heim, 333, 370.
Heinzelmann, 324.
Héricourt, 330.
Hermes, 22.
Herpes circinnatus, 442.
» tonsurans, 442.
Hess, 51.
Hesse, 240, 271, 370, 413.
Hilgendorf, 118.
Hochsinger, 167.
Hodenpyl, 331.
Hoffa, 306.
Hoffmann, 118, 359.
Hog-cholera, 383.
Holz, 208, 363.
Hueppe, 7, 15, 29, 201, 211, 218, 219, 242, 249, 276, 339, 382, 383, 390, 400, 413.
Husson, 22.

Iasuhara, 54.
Idrato di calcio, 71.
Idrogeno (Azione dell'), 63.
» solforato, 20, 24, 63.
Iensen, 388.
Ifomiceti (Colorazione degli), 167.
» patogeni, 438.
Ilkewitsch, 337.
Immunità, 37. Congenita, 39. Acquisita, 39. Artificiale, 39-46. Teorie dell' immunità, 48.

Inclusione (In paraffina), 88.
» (In celloidina), 90.
Indolo, 20.
» (Reazione dell'), 393.
Infettive (Malattie), 28.
Influenza (Bacillo dell'), 372.
Innesto preventivo, 39.
Innesto nei mezzi nutritivi, 222. Lineare, 222. Per infissione, 236. Per strisciamento, 237.
Innesto negli animali, cutaneo, 255. Sottocutaneo, 256. Nelle sierose, 258. Nell'occhio, 258. Endocranico, 259. Endovenoso, 259.
Intossicazione, 32.
Iodio (Colorazione col), 127, 142.
Iodoformio, 71.
Israel, 118, 179, 432, 434, 435.

Jacobi, 191.
Jager, 71.
Jersin, 28, 330.

Kamen, 363.
Kammerer, 276.
Kantack, 345,
Karlinski, 211, 368, 371, 430.
Kartulis, 445.
Kaufmann, 161.
Kekulé, 242.
Kiener, 276.
Kiessling, 408.
Kipp, 243.
Kirchner, 71, 218, 333.
Kitasato, 46, 55, 240, 314, 319, 322, 327, 340, 362, 372, 391, 396, 398, 400.
Kitt, 36, 42, 315.
Klebs, 2, 50, 88, 178, 190, 325.
Klein, 409.
Klemperer, 422.
Knauer, 124.
Köbner, 347.
Koch, 2, 4, 11, 13, 15, 17, 25, 35, 37, 41, 63, 64, 67, 77, 80, 81, 82, 92, 9 , 95, 96, 100, 117, 118, 125, 130, 132, 188, 140, 142, 144, 162, 171, 173, 186, 138, 215, 219, 220, 257, 261, 270, 284, 294, 300, 301, 310, 325, 338, 340, 359, 381, 389, 394, 396, 409, 445.
Kolessnikoff, 220.
König, 131.
Koristka, 76, 79, 80.
Kossel, 358.
Kostjurin, 307.
Kraïnsky, 307.
Kràl, 200, 238, 439.
Kranzfeld, 349.
Kruse, 420, 459.
Kühne, 135, 137, 139, 140, 161, 163, 164.

Laccamuffa, 208.
Laguerrière, 57.
Laplace, 69.
Lassar 22.
Lastre di vetro, 120.
Latte, 198.
Latte di calce, 71.
Latteux, 91.
Lautenschläger, 115.
Laveran, 446.
Laverania malariae, 455.
Lazarus, 411.
Lebbra (Bacillo della), 342.
Leber, 428.
Lebert, 432.
Lehmann, 14, 303.
Leloir, 333.
Leo, 38, 349.
Leptotrix, 7, 13.
Letulle, 329.
Leucina, 20.
Leucociti (Melaniferi e plasmodiferi), 456.
Levis, 81, 82, 186.
Levy, 431.
Leyden, 423.
Liborius, 19, 32, 240.
Lickfett, 410.
Lipez, 191.
Lisolo, 70, 124.
Lister, 231.
Löffler, 12, 38, 40, 94, 164, 196, 219, 261, 348, 352, 359, 381, 390, 408.
Löffler (Soluzione di), 135, 136, 144.
Lothar Meyer, 115.
Löwenthal, 411.
Lubarsch, 51, 309, 398.
Luce (Azione della), 55.
» solare diretta (Attenuazione mediante la) 35, 36.
Ludwig, 22.
Lungensen, 41.
Lustgarten, 165, 361.
Lutz, 343.

Maas, 26.
Maassen, 197.
Macè, 300, 371.
Madura (Piede di) 442.
Maffucci, 329, 335.
Malachite (Verde di), 73.
Malaria, 446.
Malassez, 342.
Malattia dei cenciaiuoli, 310.
Maljutin, 402.
Malleina, 351.
Mal rosso dei suini (Vaccinazione), 42.
» » (Bacillo del), 381.
Manfredi, 9.
Mantegazza, 324.
Marchiafava, 446, 451.
Martin, 306, 327.
Mastzellen (Ehrlich), 170.
Materie fecali (Disinfezione delle), 67, 70, 71, 72.
Matterstock, 166, 372.
Meissner, 8.
Meyer, 89, 115.
Melanina, 455.
Melcher, 345.
Membrana (Dei microrganismi), 10 (Delle spore), 15, 16.
Mensi, 369.

Mendelsohn, 57.
Mentagra, 442.
Merismopedia, 13.
Metilamina, 26.
Metilguanidina, 27.
Metschnikoff, 29, 50, 51, 52, 306, 392, 398, 411, 412, 414, 415.
Meunier, 72.
Mezzi decoloranti, 132.
» (Di nutrizione) colorati, 363.
Mibelli, 410.
Micoderma, 10.
Micomucina, 11.
Micoproteina, 10.
Micrococchi, 6. Piogeni, 70, 71, 426.
Micrococco tetragono, 37, 336, 441.
Micrococcus phosphorescens, 22.
Microfotografia, 80.
Microscopio, 74.
Microsporon furfur, 442.
Microtomo, 83. A slitta (Thoma-Jung), 44. A vite (Schanze), 85. Automatico, 86.
Midaleina, 27.
Midatossina, 27.
Mikulicz, 384.
Miller, 415.
Miquel, 59, 102, 117, 119, 214, 225, 231, 269, 274, 279, 280, 285, 290.
Mitilotossina, 27.
Moccio, 34, 66, 163.
Moeller, 305.
Momont, 56.
Monospora bicuspidata, 50.
Monti, 363, 419.
Morax, 390.
Moreau, 279.
Morfologia (Dei microrganismi), 1.
Morva (Bacillo della), 34, 66, 348.
Mosso, 26, 461.
Movimento (Azione del), 58.
Movimenti dei batteri, 12, 62.
Mucor corymbifer 438.
» rhyzopodiformis, 438.
Müller, 2, 6, 9.
Muscarina, 27.
Musco d'Irlanda, 214.
Mus musculus, 254, 308,

Nachet, 118.
Nägeli, 2, 3, 4, 5, 8, 17, 18, 97, 195, 231.
Nanievicz, 164.
Neisser, 13, 163, 192, 342, 343, 344, 422.
Nencki, 8, 10, 11, 26, 250, 388.
Netter, 388.
Neuhauss, 83, 368.
Neumann, 368.
Neurina, 27.
Neuridina, 26.
Neve, 258.
Nicati, 261, 398, 402, 409.
Nicolayer, 300, 316.
Nicolle, 366, 390.
Nikiforoff, 250.
Nissen, 53.
Nitrato d'argento, 70.
Nitrificazione, 24.
Nitrito potassico, 362.
Nocard, 40, 108, 214, 216, 326, 339, 352, 437.
Nöggerath, 208, 363.
Nolen, 41.
Nomenclatura dei microrganismi, 2.
Nordtmeyer, 107.
Nothnagel, 127.
Nucleo (Dei batteri), 10.
Nuttal. 50, 53.

Obbiettivi ad immersione, 74. Apocromatici, 75. Semi-apocromatici, 76.
Obermeyer, 82, 415.
Oculari compensatori, 76.
Oetlinger, 380.
Ogata, 54.
Olii essenziali, 72.
Olio d'anilina, 134, 140.
Orth, 416, 430.
Ortmann, 345.
Oreste, 383.
Orlandi, 367.
Orlow, 369.
Ossido di carbonio, 63.
Ossigeno (Azione dell'), 62.
» (Attenuazione mediante l'), 36.
Ostie, 302.
Ozono, 62.

Palloncini di Pasteur, 119.
Panke, 383.
Pansini, 420.
Panum, 25.
Pappa di pane, 202.
Paraffina (Inclusione in), 88.
Pararosanilina, 144.
Parassiti assoluti, 28. Facoltativi, 29. Della malaria, 446. Del cancro, 444.
Pasquale, 398.
Pasteur, 2, 19, 23, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 43, 46, 50, 62, 93, 94, 97, 112, 119, 195, 233, 250, 259, 269, 300, 301, 310, 382.
Parietti, 362.
Passet, 389.
Patata, 199.
Patogeni (Batteri), 20, 28. Tossici, 2. Infettanti, 32.
Pawlowsky, 46, 307, 326, 412.
Peiper, 320.
Penzo, 312.
Peptone, 395.
Peptotossina, 26.
Peripneumonite dei bovini (Vaccinazione), 41.
Perroncito, 42, 382, 432.
Peste degli animali selvatici, 383. Suina, 381, 383.
Petruschky, 51, 53, 198, 208, 328.
Pettenkofer, 21, 268, 370, 410.
Petri, 197, 205, 230, 279, 394, 398.
Pfeffer, 233.
Pfeiffer, 83, 342, 359, 372, 400, 414, 459.
Phisalix, 304.
Pfuhl 71, 340, 401.

Pflüger, 21.
Picrocarmino, 129.
Piede di Madura, 442.
Pigmento (Formazione del), 11, 21, 57.
Pioctanina, 73.
Pipette di vetro, 225.
Pityriasis versicolor, 442.
Plaut, 190, 238, 440.
Plehn, 446, 457.
Pneumobacillo di Friedländer, 10, 46, 341, 383.
Pneumococco, 383.
Pneumomicosi aspergillina, 439.
Pöel, 41, 393.
Polimitus malariae (avium sive hominis), 460.
Pollender, 301.
Polmonite crupale, 416.
Ponfick, 432, 436.
Portoggetti incavati, 118.
Potere microbicida (del siero di sangue), 53.
Pouchet, 269.
Pozzo, 219.
Prausnitz, 238, 333.
Pravaz, 118, 256.
Prazmowsky, 15, 17.
Preparati sui coproggetti, 140, 178. In goccie sospese, 118, 177.
Pressione (Azione della), 58.
Prior, 392, 401, 414.
Prodotti (del ricambio dei batterî), 19, 63.
Proteine batteriche, 28, 52.
Proteo, 5, 10.
» capsulato, 384.
Proteus vulgaris, 45, 46.
Protisti, 1.
Protoplasma cellulare, 10, 11.
Protossido d'azoto, 63.
Protozoi parassitarî, 443.
Prove, 14.
Prudden, 28, 60, 331, 358,
Ptomaine, 20, 25.
Pus verde, 378.
Puccinelli, 214.
Putrefazione (Batterî della), 20.
Putrescina, 26.

Quinke, 440.

Rabbico (Virus), 34. Attenuazione del, 36, 62.
Rabbia canina (Vaccinazioni), 40, 43.
Raccuglia, 383.
Rayer, 301.
Ranvier, 118.
Rattone, 316.
Raulin, 50.
Reattivi rischiaranti, 178. Decoloranti, 137.
Reagenti chimici (Azione dei), 63,
Reazione dei mezzi nutritivi, 18.
» dell'indolo, 362.
» del rosso colerico, 394.
Recettività individuale, 37.
Recklinghausen, 118, 125, 178.
Rekowsky, 402.
Reichert, 76, 79, 80, 114, 115.
Reimers, 298.
Reinsch, 284.
Refrattarietà, 39.
Regnard, 58.
Regolatori (Della pressione del gas), 117.
Reymond, 432.
Ribbert, 8, 51. 52, 359, 429, 431.
Richet, 330.
Riedel, 371.
Rietsch, 25, 261, 398, 402, 409.
Rindfleisch, 118.
Rinoscleroma, 383.
Riproduzione per scissione, 12. Per spore, 12.
Risipola, 424.
Rivolta, 432.
Rodet, 362, 366.
Roemer, 241.
Roger, 47, 315.
Rohrbeck, 112, 115, 116, 118.
Roloff, 340.
Rosenbach, 316, 428.
Rosenthal, 348.
Rosso di fucsina, 131.
Roster, 83.
Roth, 30.
Rouget, 320.
Roux, 14, 28, 36, 40, 45, 49, 56, 57, 105, 112, 117, 201, 214, 216, 245, 249, 267, 303, 304, 307, 313, 3 5, 323, 326, 339, 351, 353, 356, 358, 366.
Rubner, 408.

Sabourand, 329.
Sackharoff, 354.
Sali (Attenuazione mediante i), 36.
Salkowski, 72, 393.
Salmon, 45.
Salomonsen, 94, 176, 229, 231, 325.
Salvioli, 417.
Sanarelli, 365, 367, 408,
Sander, 326.
Sanfelice, 312, 459.
Saponi alcalini, 71.
Saprina, 26.
Saprofiti, 29.
Sarcina, 13.
Sawtschenko, 397.
Scatole di vetro (Di Petri e di Soyka), 119.
Schanze, 83.
Schenck, 219.
Scheurlen, 426.
Schiefferdecker, 91.
Schill, 202, 406.
Schiller, 360, 406.
Schlagenhaufer, 423.
Schmiedeberg, 26.
Schmorl, 438.
Scholl, 339.
Schönlein, 439.
Schottelius, 12, 21, 70, 210, 238, 404.
Schreider, 358.
Schüller, 325.
Schultz, 205.
Schütz, 166, 348, 381.

Schwann, 268.
Schwarz, 317.
Sclavo, 191, 267, 287.
Selmi, 26.
Semiapocromatici (Obbiettivi), 176.
Setticemia emorragica, 382.
» dei topi, 381.
Sezioni, 90 (Colorazione delle), 132.
Sicosi, 442.
Siero del sangue (Apparecchio per solidificare il), 102. (Potere microbicida del), 53.
Siero dei trasudati, 219.
» di latte, 198.
Sifilide, 165.
Siringhe per iniezioni, 118.
Sirotinin, 49, 106.
Smith, 45, 250.
Sobernheim, 408.
Solfato di ferro, 70.
» di soda, 280.
Soluzioni coloranti, 132.
Soluzione (Dei colori d'anilina), acquosa, 132. Alcoolica, 132. Idralcoolica, 133. Di Ehrlich, 134, 142, 144. Di Friedländer, 127. Di Kühne, 135. Di Löffler, 135, 136. Di Lugol, 127. Di Ziehl, 135.
Sonntag, 62.
Sormani, 31, 321, 363.
Sostanze coloranti, 125.
» tossiche, 25, 32.
» cromogene, 21.
Soudakewitsch, 343, 416,
Soyka, 200,328.
Sozoiodolo, 71.
Spasmotossina, 321.
Spener, 446.
Spengel, 86.
Spengler, 383.
Spilker, 57.
Spirilli, 67.
Spirochaete Obermeyer, 179, 415.
Spirulina, 7.
Spore, 12, 16, 60, 61, 137. Resistenza delle, 16, 60. Colorazione delle, 16. Del carbonchio, 56, 60, 61, 63, 65, 67, 69, 70, 72. Del tetano, 72.
Sporificazione endogena, 14.
Spronck, 356.
Sputi (Disinfezione degli), 60, 70, 71,
Stafilococco piogeno albo, 431.
» » aureo, 60, 67, 71, 427.
Steinschneider, 424.
Sterilizzazione, 110, 120.
Sterilizzatori (Apparecchi), 92.
Sterilizzatore-filtro d'Arsonval, 107.
Stevenson, 258.
Stilling, 72, 73.
Straus, 256, 276, 331, 350, 371.
Streptococchi, 7, 10, 13.
Streptococco della risipola, 31, 46, 51, 44.
» Piogeno, 70, 424.
Streptotrix cuniculi, 438.
» farcinica (Nocard), 437.
Stufa di Koch ad aria secca, 92.
» di Pasteur » » 93, 94.
Stutzer Burri, 405.
Sublimato corrosivo, 65, 67, 69.
Succo gastrico (Potere microbicida del), 31.
Sutura di Meyer (Per paraffina), 89.

Tannino, 181.
Tarchanoff, 220.
Tavel, 372.
Tavolo riscaldante di Israel, 118. Di Vignal, 118.
Tedeschi, 346.
Temperatura (Azione della), 31. Attenuazione per mezzo della, 35. Influenza sull'attività dei disinfettanti, 66.
Teppeiner, 324.
Termofili (microrganismi), 214.
Termoregolatore a membrana di Schlösing, 109. Di Reichert, 114, 115. Di Rohrbeck, 116. Di Lautenschläger, 116. Di Babes, 116.
Termostato d'Arsonval, 109, 111. Di Pasteur-Roux, 112. Di Rohrbeck, 119. Di Hueppe, 113. Di Schottelius, 114. Di Babes, 114. Di Lautenschläger, 114.
Terreno, 296.
Tetano. Bacillo del, 316. Antitossina del, 55. Vaccinazione contro il, 46.
Tetanina, 321.
Tetanotossina, 321.
Tetragono (Micrococco), 13.
Teuscher, 99.
Thoinot, 362.
Thomas, 36, 313.
Thoma-Jung (Microtomo), 83.
Tilanus, 22.
Tirotossina, 27.
Tifo addominale (Bacillo del), 359.
Tifosimili (Bacilli), 362.
Tifotossina, 365.
Tizzoni, 28, 55, 317, 318, 321, 322, 396, 397, 402, 431.
Tommasi-Crudeli, 461.
Torule, 7.
Tossalbumina, 20, 28.
Tossine, 20, 26.
Toussaint, 35, 325.
Treskow, 207.
Tricophyton tonsurans, 169, 141.
Trimetilamina, 26.
Trommsdorf, 131.
Tubercolina, 325, 338.
Tubercolosi (Bacillo della), 324. Dei galinacei, 329. Zoogleica, 341.
Tubi da saggio, 119.
Tursini, 118, 257.
Tyndall, 100.

Udometro, 288.
Uffelmann, 280, 364, 370, 400, 401, 413.
Uhthoff, 359.
Unna, 139, 212, 347.
Uova, 249.

Vaccinazione, 39. Antirabbica, 43. Anticarbonchiosa, 41. Antivaiuolosa, 44.
Vaillard, 318, 320, 321, 323.

Van Tieghem, 1, 9.
Variazioni morfologiche (Dei microrganismi), 5.
Vaughan, 27.
Veleni cadaverici, 20, 25.
Verde di malachite, 73.
Verga, 324.
Verneuil, 321.
Vesuvina, 132.
Vibrione del colèra, 389. Di Deneke, 414. Di Metschnikoff, 414. Di Finkler e Prior, 414.
Vidal, 362, 365, 367.
Vignal, 118, 342.
Villemin, 324.
Vincent, 318, 319, 321, 362, 369.
Vincenzi, 411.
Violetto di genziana, 131, 134. Di metile, 131, 134.
Virchow, 340.
Virus rabbico, 34, 36, 62.
Voges, 393.
Vogler, 408.
Vogt, 89.

Wagner, 127.
Wassermann, 357, 411.
Wasserzug, 380.
Weibel, 407.
Weichselbaum, 416.
Weigert, 125, 126, 127, 129, 130, 134, 138, 139, 140, 142, 144.
Wernicke, 358.
Wertheim, 423.
Weyl, 107, 240.
Wiener, 391, 408.
Wiesnegg, 112, 118.
Wissokowitsch, 30, 38, 62, 430,
Witte, 394.
Wolff, 435.
Wolffhügel, 371.
Wooldridge, 45, 46, 307.
Wortmann, 24.
Wurtz, 276.

Xillaria hypoxylon, 22.

Yersin, 353, 356, 358.

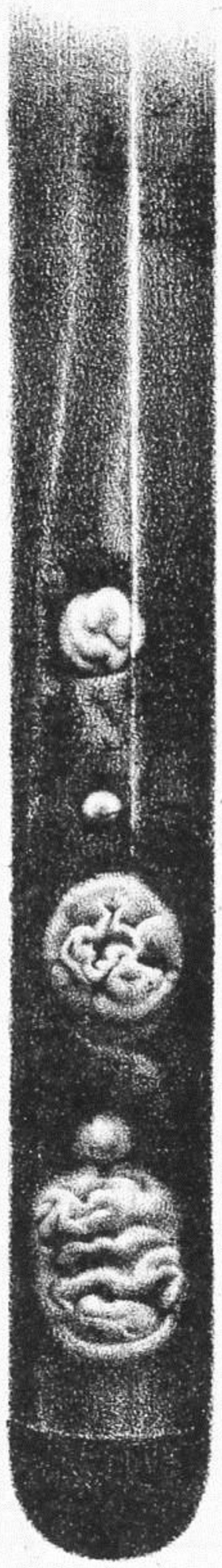
Zagari, 31, 46, 338.
Zahn, 8.
Zäslein, 417.
Zambelli, 117.
Zeiss, 75, 76, 79.
Zemann, 433.
Ziehl (Soluzione di), 135.
Zooglea, 10, 62, 128.
Zopf, 3, 6, 9.
Zucchero di canna, 280.

SPIEGAZIONI DELLE TAVOLE.

Tavola I.

Culture nell'agar di *Trichophyton tonsurans* e di *Achorion Schoenleinii* (Riproduzione fotografica).

La figura a sinistra di chi osserva rappresenta il *Trichophyton* e l'altra l'*Achorion*.



Casa Editrice DOTT. FRANCESCO VALLARDI - Milano

LIT. SALUSSOLIA - TORINO

Tavola II.

Fig.

1 a 29. Diversi tipi morfologici dei parassiti malarici (Marchiafava e Celli).

1 a 10. Forme ameboidi endoglobulari non pigmentate.

11, 12 e 13. Forme ameboidi endoglobulari pigmentate.

14 e 15. Forme pigmentate immobili di Laveran.

16, 17, 18. Forme in scissione.

19, 20, 21, 22. Forme semilunari.

23 e 24. Forme pigmentate a bordo ondulato.

25 e 26. Forme flagellate.

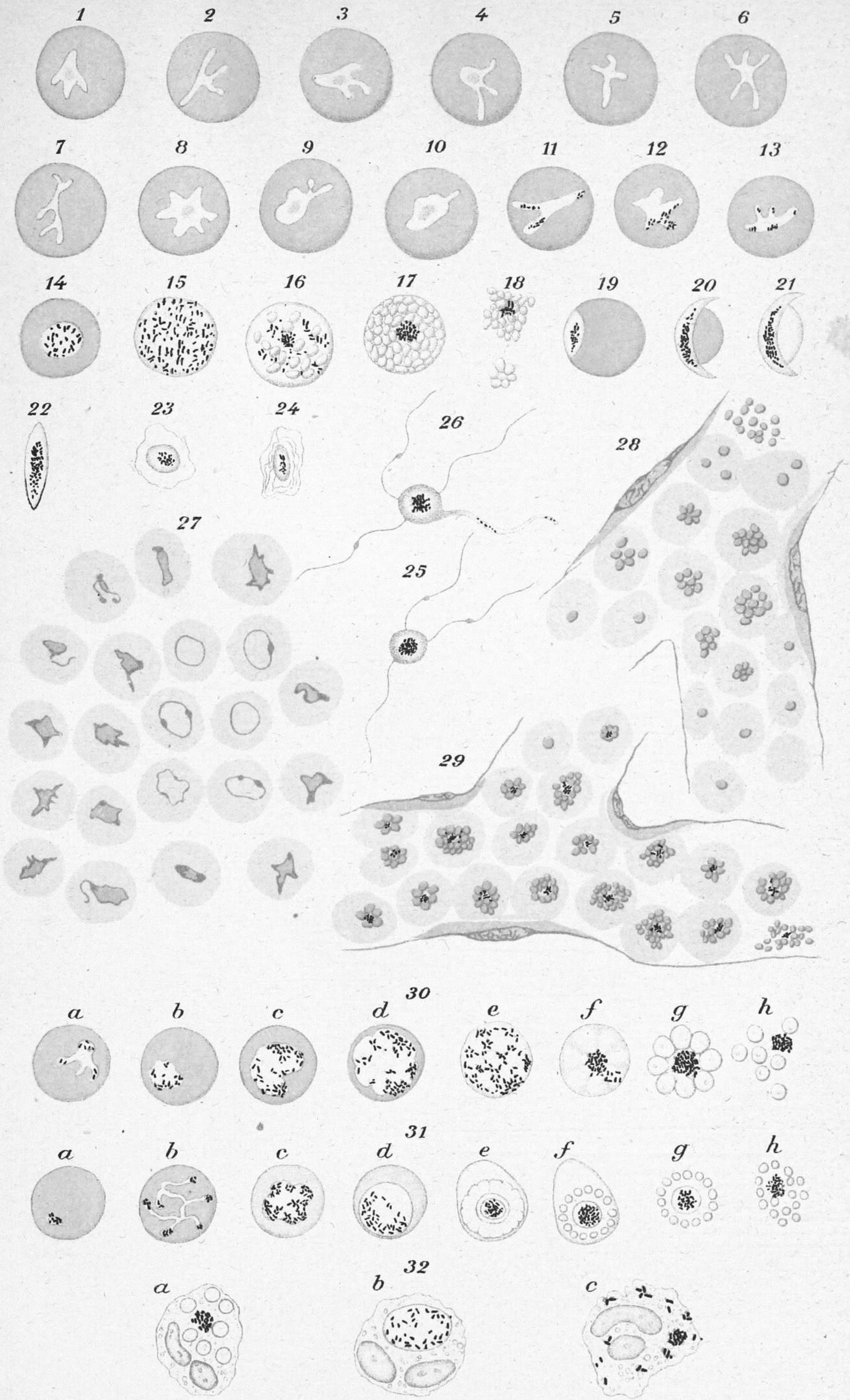
27. Forme ameboidi senza pigmento colorate coll'azzurro di metilene.

28 e 29. Forme in scissione nei capillari cerebrali, colorate coll'azzurro di metilene (perniciosa-comatosa).

30. Alcune fasi del ciclo evolutivo dei parassiti malarici nella quartana (Golgi). *a*, *b*, *c* accrescimento progressivo del parassita nei primi due giorni. — *d*, *e*, *f*, *g*, *h* maturazione e successiva segmentazione del parassita nelle 8-10 ore che precedono l'accesso.

31. Alcune fasi del ciclo evolutivo dei parassiti malarici nella terzana (Golgi). *a*, *b*, *c* accrescimento progressivo del parassita nelle prime 24 ore — *d*, *e*, *f*, *g*, *h* maturazione e successiva segmentazione del parassita nelle 8-10 ore che precedono l'accesso.

32. Globuli bianchi fagocitari nel sangue circolante. — *a* globulo bianco contenente un parassita malarico della quartana, già segmentato e disgregato (prime tre ore della febbre), *b* globulo bianco contenente un corpo pigmentato della terzana già in degenerazione, *c* globulo bianco contenente granuli ed accumuli di pigmento melanico (8-10 ore dall'inizio della febbre).



Casa Editrice DOTT. FRANCESCO VALLARDI - Milano

LIT. SALUSSOLIA, TORINO.

Tavola III.

Fig.

1. Cultura in gelatina di bacillo carbonchioso (di due giorni).
2. Cultura di bacillo della lebbra nell'agar glicerinata.
3. Cultura di bacillo tubercolare nell'agar glicerinata.
4. Colonia giovane di bacillo carbonchioso nella gelatina. — 100 d.
5. Colonia giovane di bacillo tubercolare nel siero di sangue. — 100 d.
6. Colonia giovane di bacillo del colèra nella gelatina. — 115 d.

Fig. 1

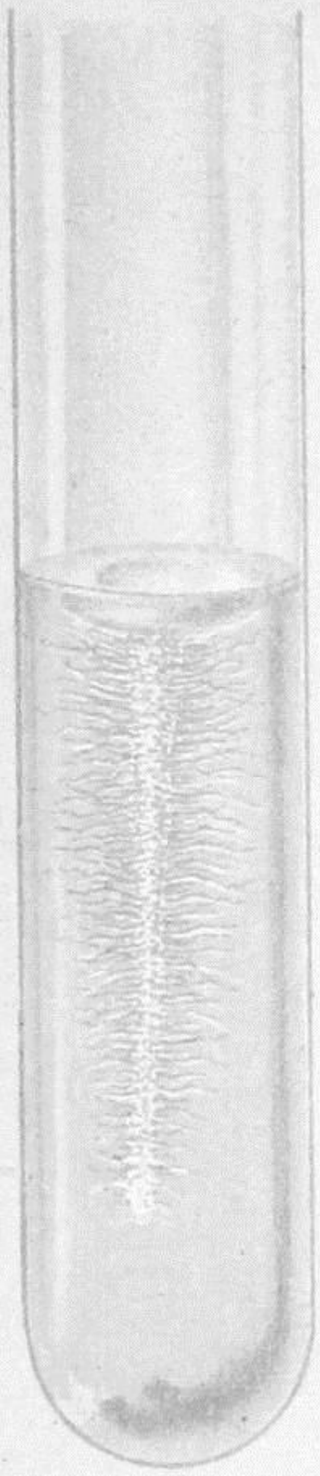


Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

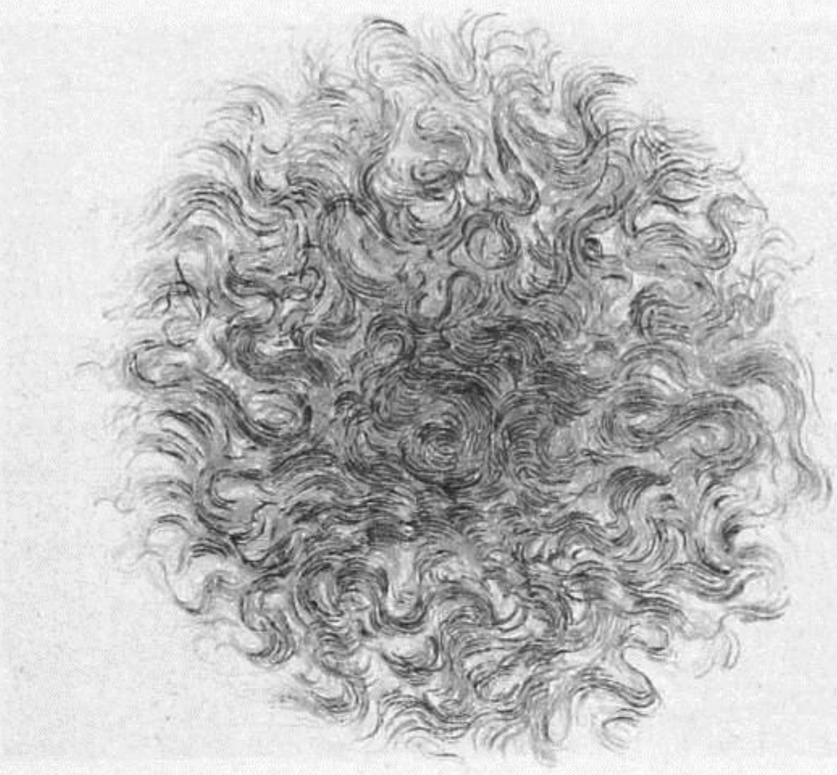


Fig. 5

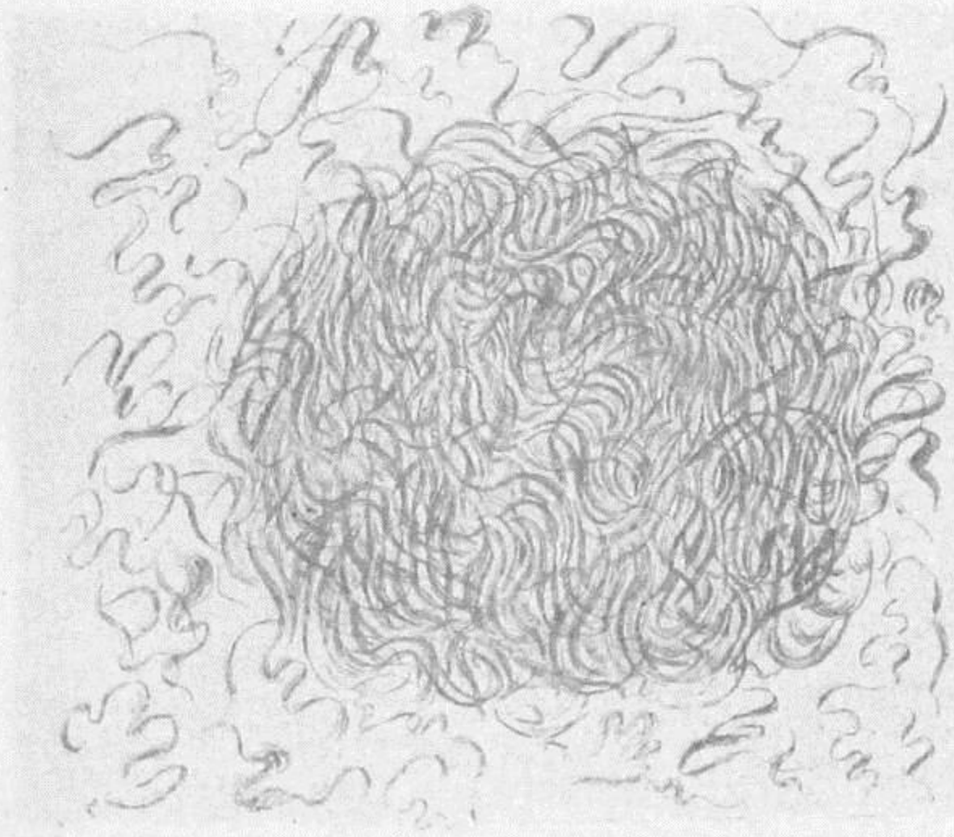
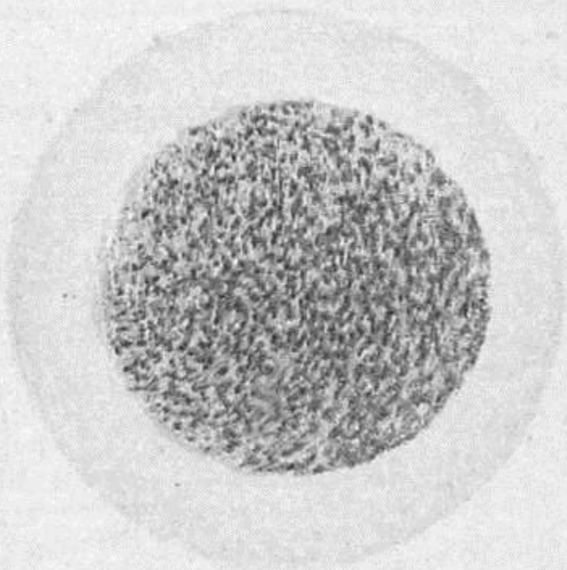


Fig. 6



LIT. SALUSSOLIA, TORINO.

Tavola IV.

Fig.

1. Cultura di proteo capsulato nella gelatina.
2. Cultura di *streptotrix farcinica* (Nocard) nell'agar glicerinata.
3. Cultura del vibrione di Deneke nella gelatina (3.ª giornata).
4. Cultura del bacillo del coléra nella gelatina (3.ª giornata).
5. Cultura di bacillo della morva sulla patata.
6. Cultura di bacillo della setticemia dei topi nella gelatina.

ACCADEMIA DI MEDICINA DI TORINO

Fig. 1

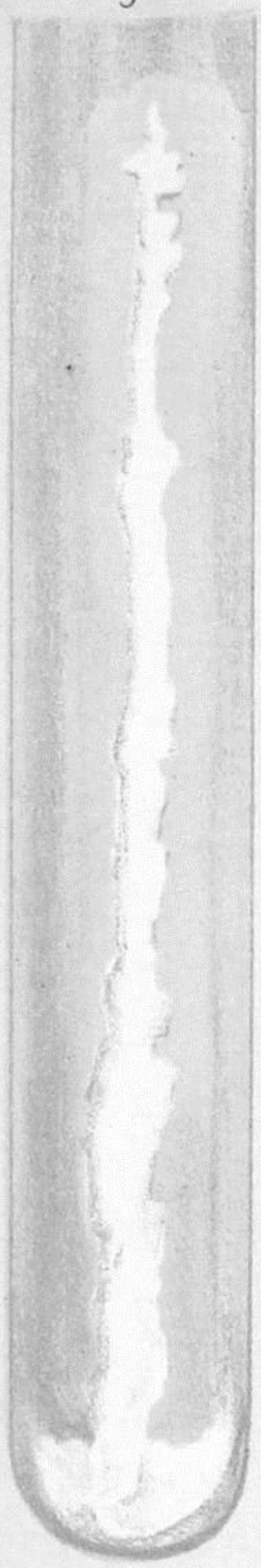


Fig. 2

Fig. 3

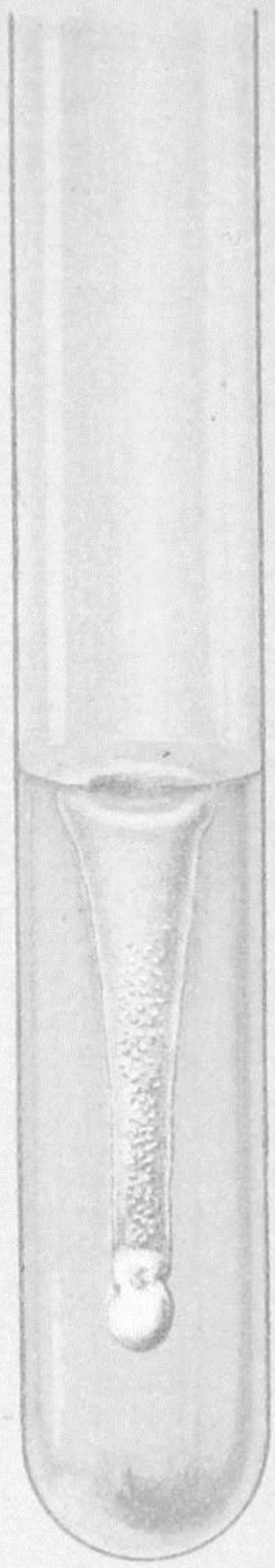


Fig. 4

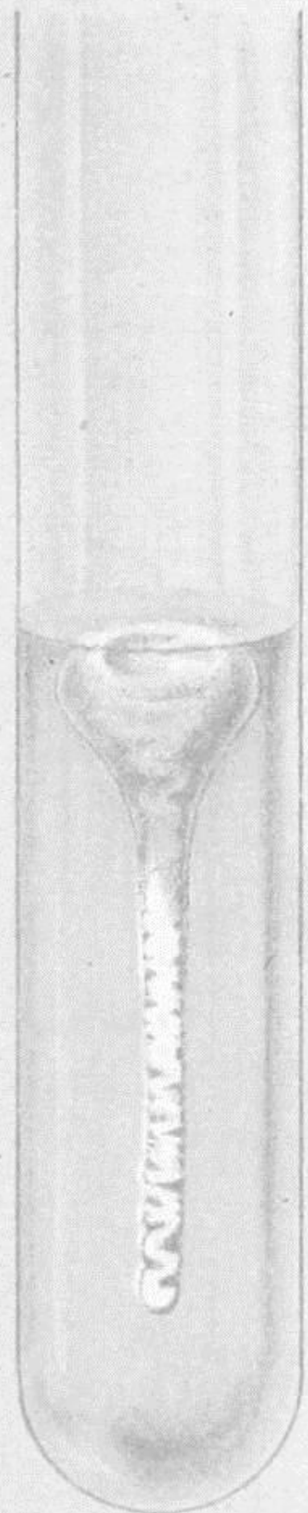
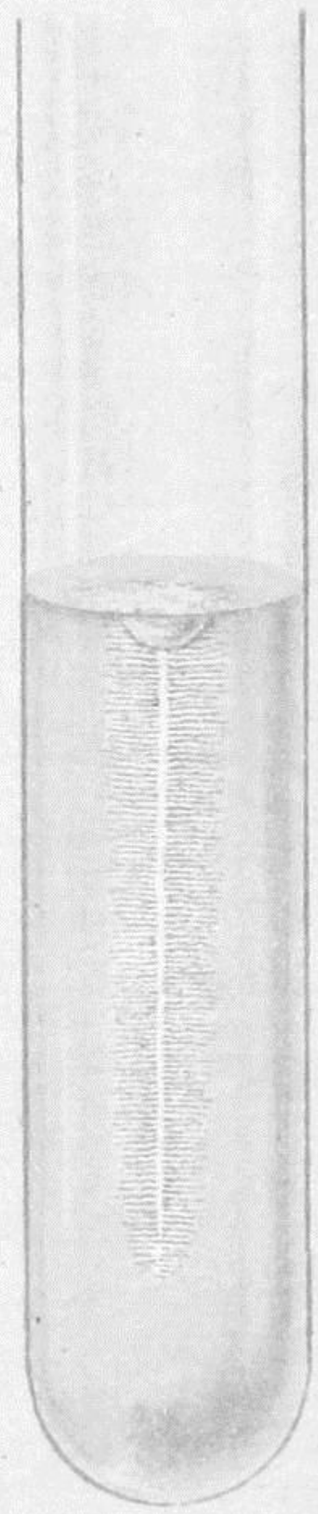


Fig. 5

Fig. 6



LIT. SALUSSOLIA, TORINO.

Tavola V.

Fig.

1. Cellule granulose di Ehrlich nell'intestino tenue di coniglio. — 750 d.
2. Cellule eosinofile e neutrofile del sangue umano. — 750 d.
3. Cellule eosinofile del sangue di pollo (coi granuli a bastoncino). — 750 d.
4. *Proteus vulgaris* colle ciglie colorate. — 1334 d.
5. Bacillo del carbonchio. Preparato fatto per schiacciamento di una piccola colonia in gelatina. — 500 d.
6. Bacilli del carbonchio. Filamenti e spore. — 750 d.
7. Bacilli del carbonchio capsulati nel sangue di topo. — 750 d.
8. Bacilli dell'edema maligno nel sangue di cavia. — 750 d.
9. Bacilli del tetano. Cultura nell'agar. — 1000 d.
10. Bacilli tubercolari nello sputo. Metodo Ziehl-Neelsen. Colorazione doppia (micrococco tetragono e streptococco. colorati in azzurro). — 750 d.
11. Cellula gigante contenente bacilli tubercolari (tubercolosi periostea della tibia nell'uomo). — 950 d.
12. Bacilli della difterite. Cultura nell'agar. — 1000 d.

Fig. 1

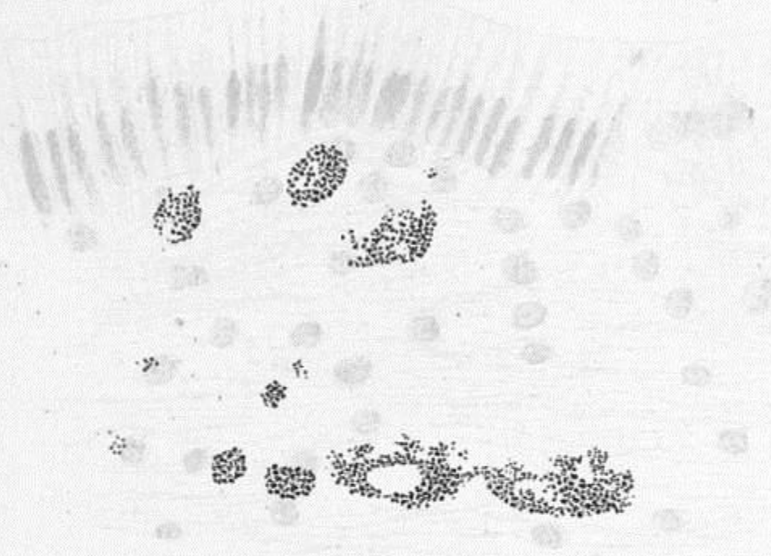


Fig. 2

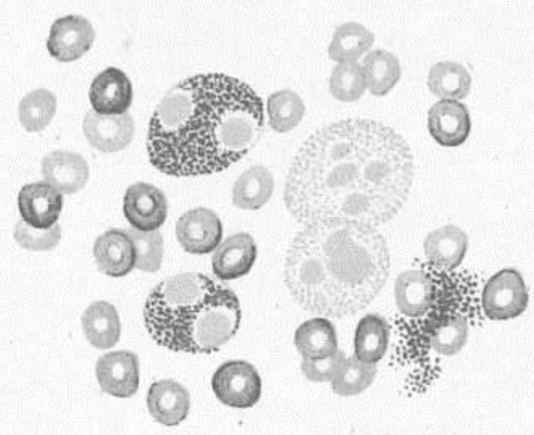


Fig. 3

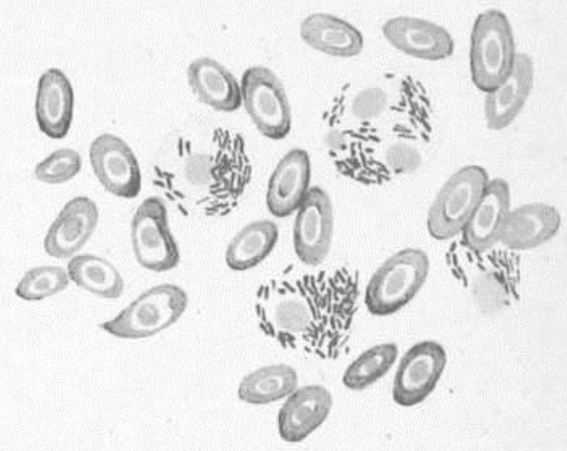


Fig. 4

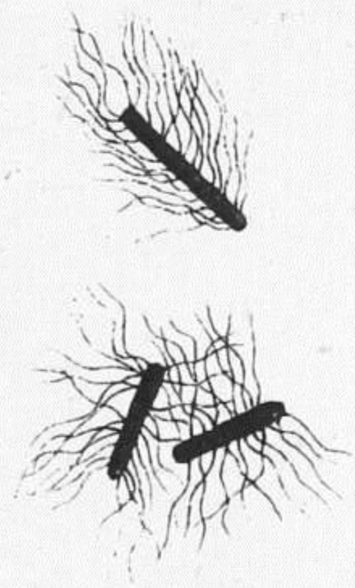


Fig. 5

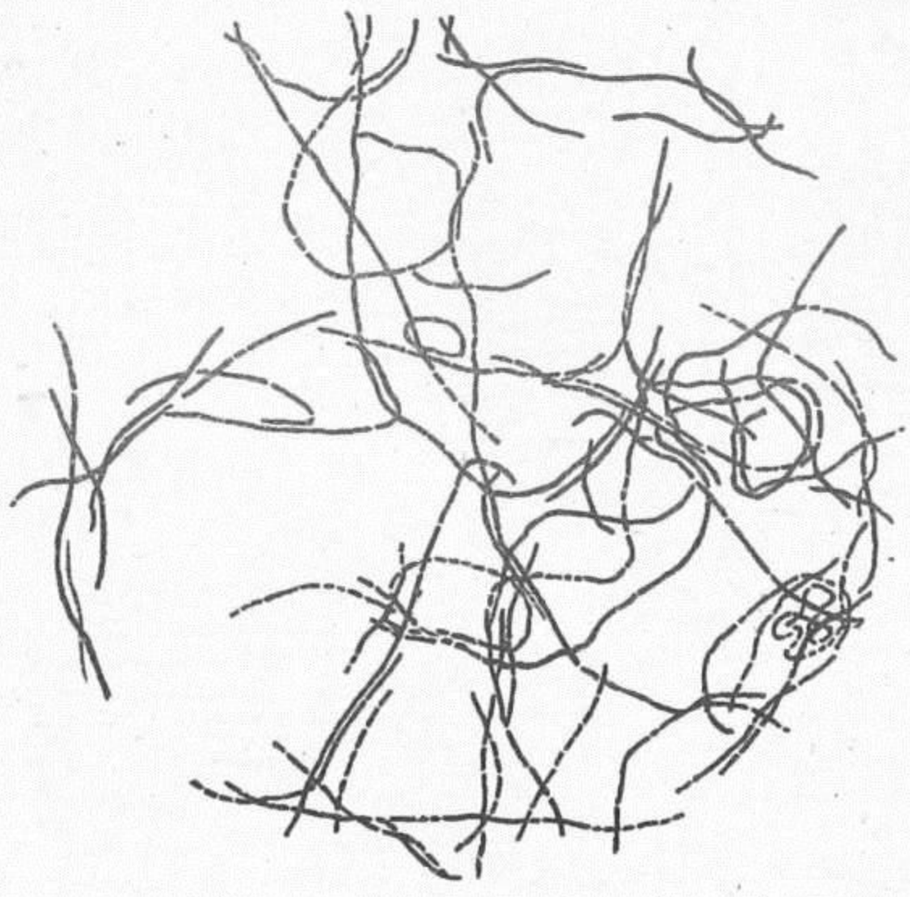


Fig. 6

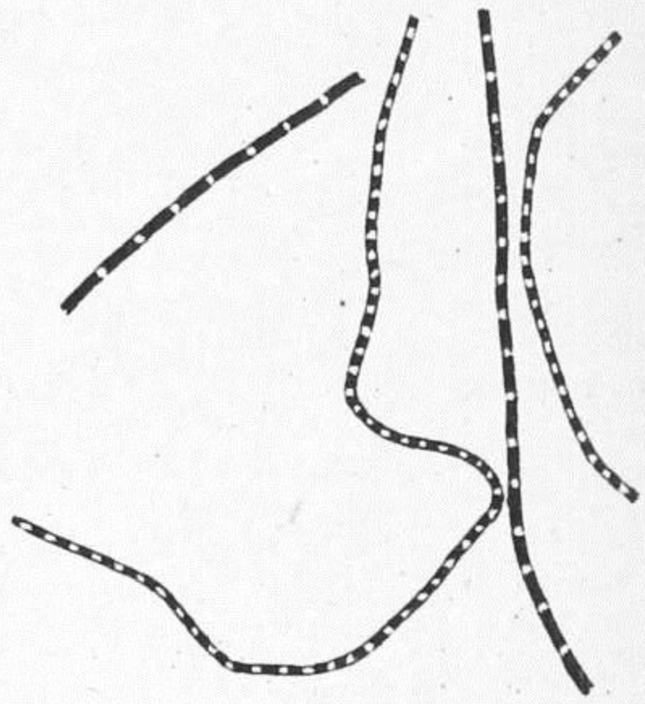


Fig. 7

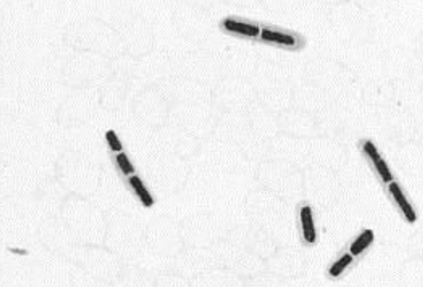


Fig. 8

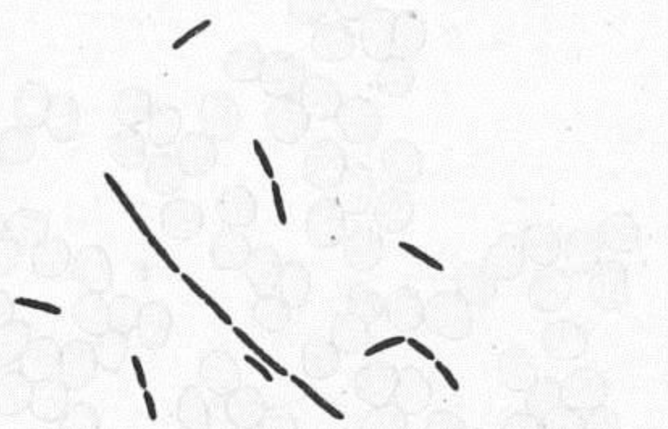


Fig. 9

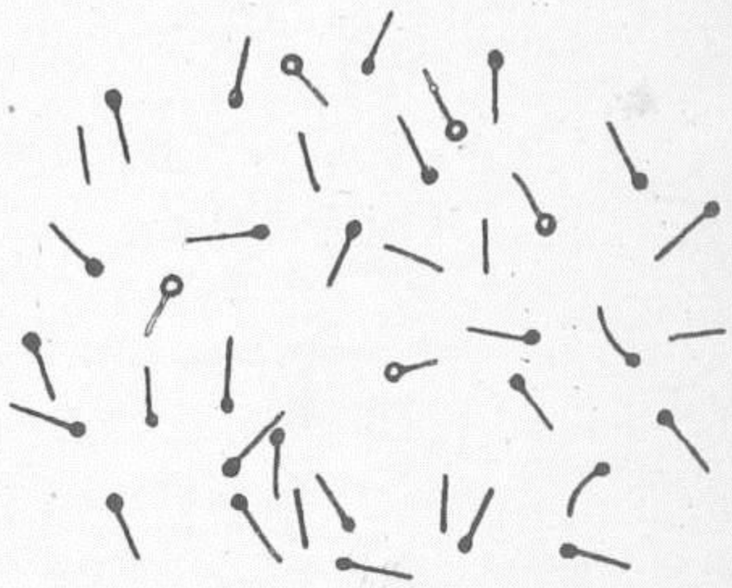


Fig. 10

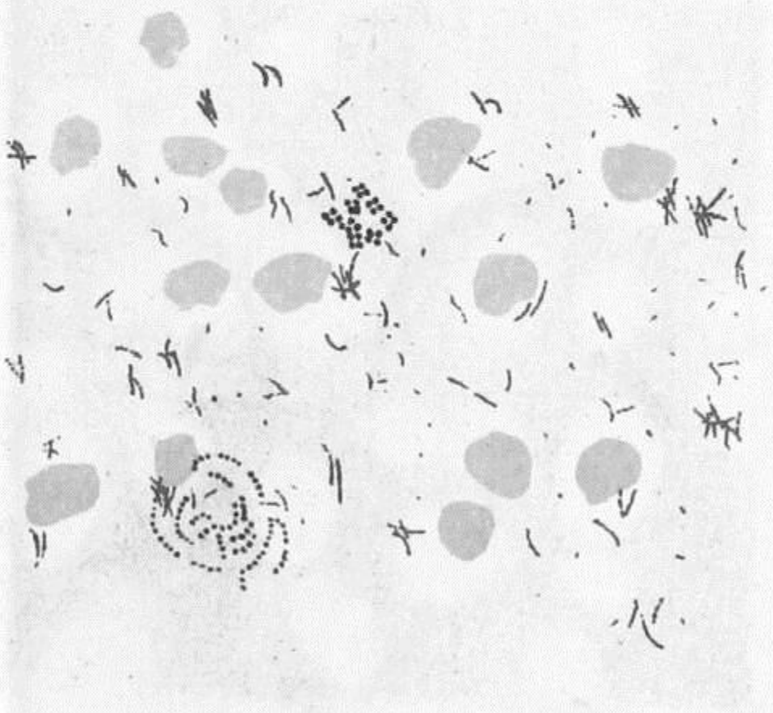
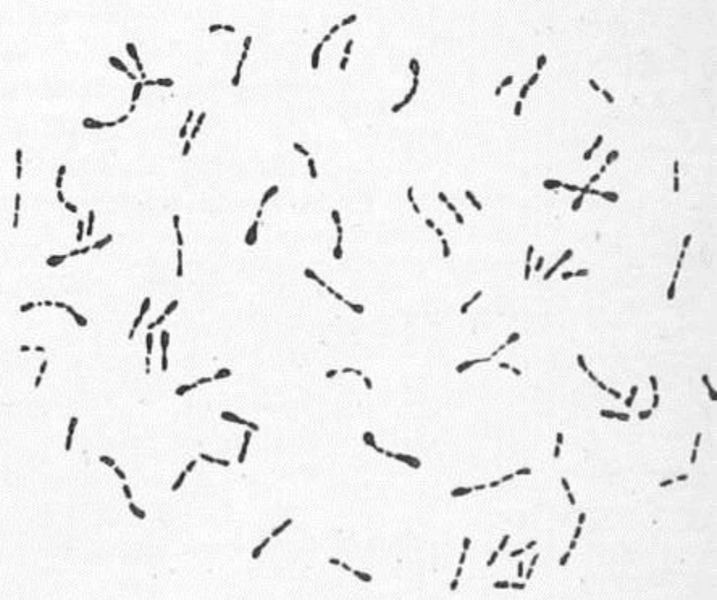


Fig. 11

Fig. 12



LIT. SALUSSOLIA, TORINO

Tavola VI.

Fig.

1. Bacilli della lebbra. Cultura nell'agar glicerinata, 1.ª generazione (Metodo Koch-Ehrlich). — 750 d.
2. Bacilli della lebbra nel midollo delle ossa. — 750 d.
3. Bacilli della lebbra nel fegato. — 750 d.
4. *Streptotrix farcinica* (Nocard). Cultura nel brodo glicerinato. — 750 d.
5. *Streptotrix farcinica* nel polmone di cavia. Metodo Gram (violetto di genziana ed eosina). — 750 d.
6. Bacilli della morva. Cultura sulla patata. — 750 d.
7. Bacilli della morva nella milza di topo campagnuolo. — 750 d.
8. Bacilli del tifo. Cultura in gelatina. — 750 d
9. Bacilli del tifo in una sezione di ghiandola mesenterica dell'uomo. — 750 d.
10. Bacilli dell'influenza (Bruschettini) nel muco bronchiale di coniglio. — 1000 d.
11. Bacilli dell'influenza (Pfeiffer) nei corpuscoli mucosi del secreto bronchiale dell'uomo. — 1000 d.
12. Bacilli della setticemia dei topi nel fegato di topolino bianco. — 1000 d.

Fig. 1

Fig. 2

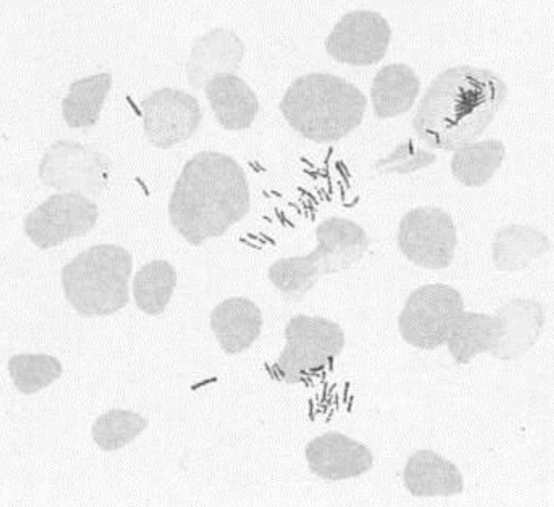


Fig. 3

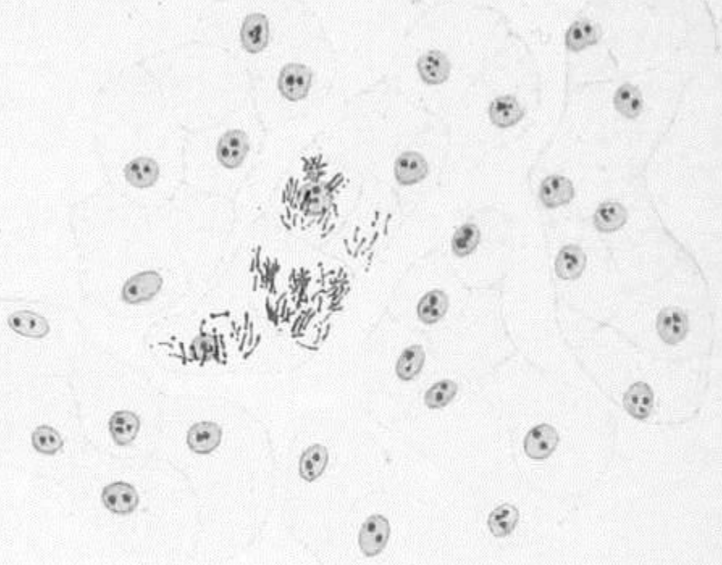


Fig. 4

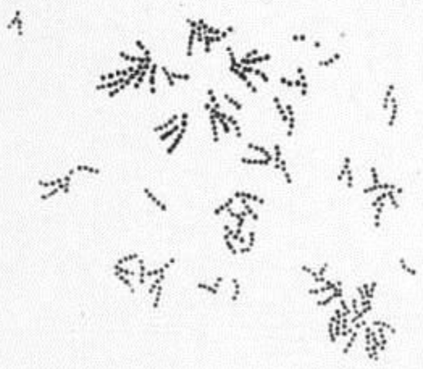


Fig. 5

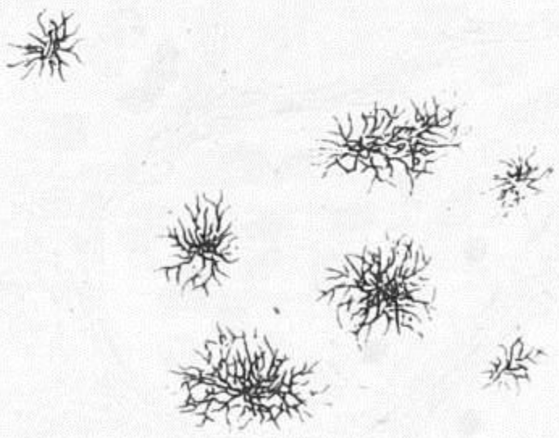


Fig. 6

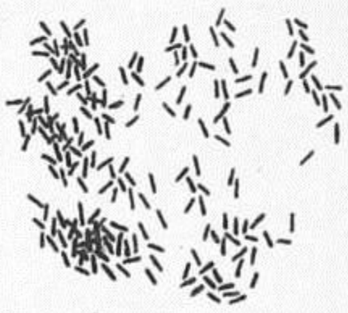


Fig. 7

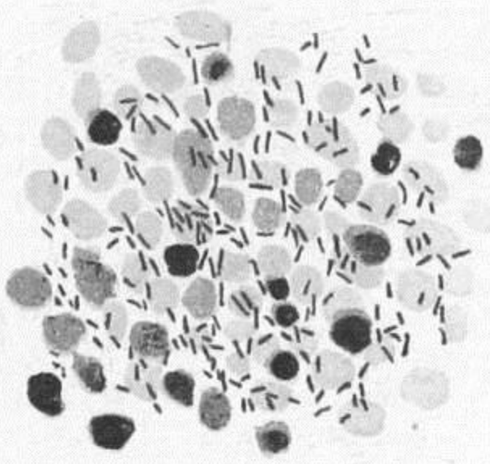


Fig. 8

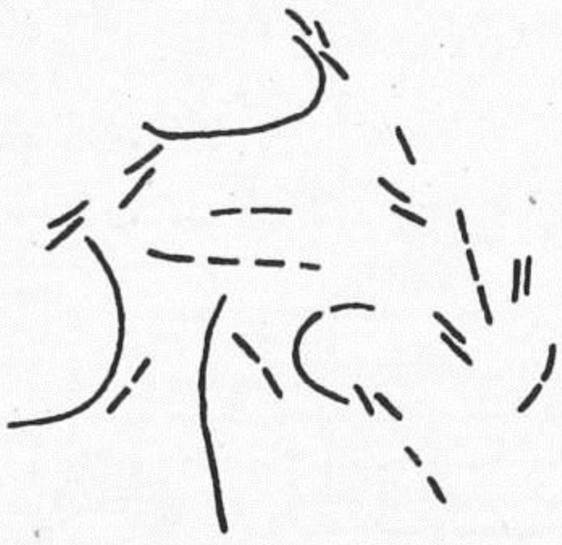


Fig. 9

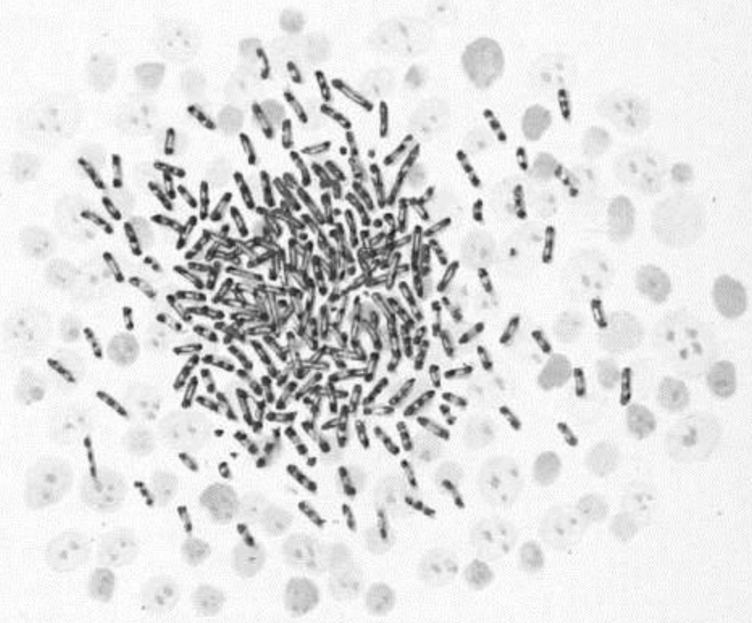


Fig. 10

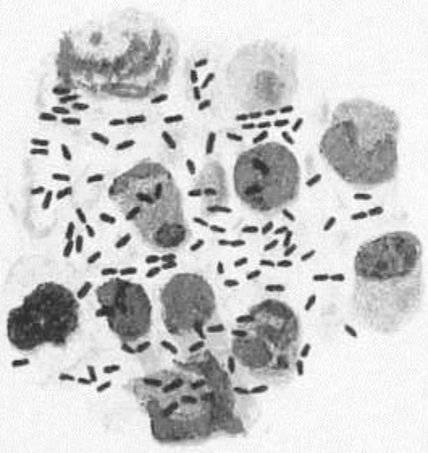


Fig. 11

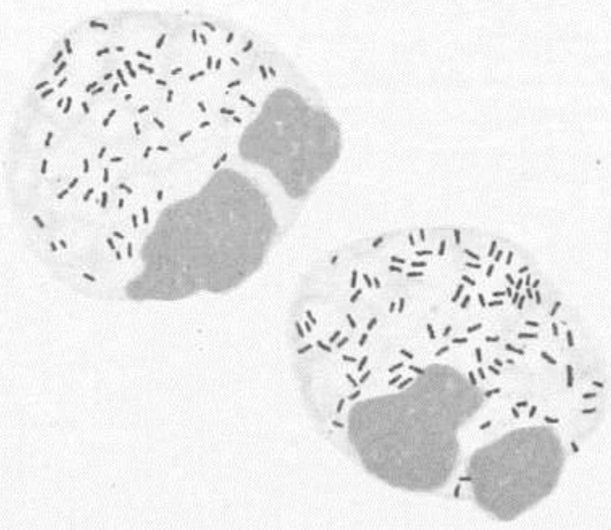
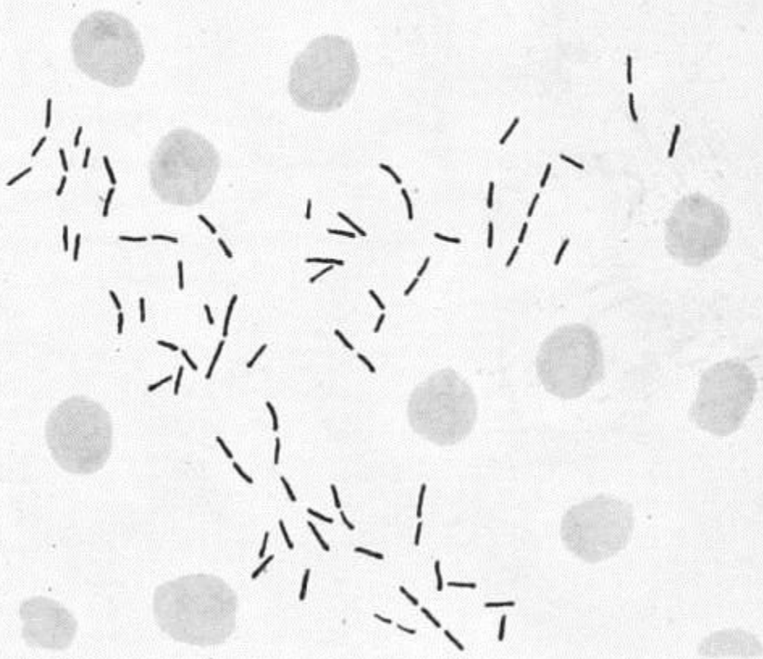


Fig. 12



LIT. SALUSSOLIA, TORINO

Tavola VII.

Fig.

1. Bacilli del coléra nelle feci diarroiche. — 750 d.
2. Bacilli del coléra. Cultura nel brodo alcoolizzato (spirilli). — 750 d.
3. Bacilli del coléra. Cultura nell'agar. — 750 d.
4. Bacilli del colèra dei polli (setticemia emorragica) nel sangue. — 750 d.
5. Pneumobacillo di Friedländer. Cultura nella gelatina. — 750 d.
6. Bacilli del rinoscleroma. Cultura nell'agar (con capsule). — 750 d.
7. Proteo capsulato. Cultura nella gelatina di 12 ore. — 667 d.
8. Proteo capsulato. Cultura nell'agar di 1 giorno (capsule segmentate). — 667 d.
9. Proteo capsulato. Sezione dell'intestino di topo. — 750 d.
10. Spirilli della febbre ricorrente nel sangue umano. — 1000 d.

Fig. 1

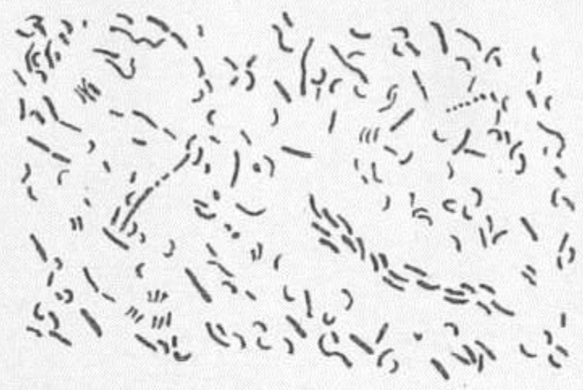


Fig. 2

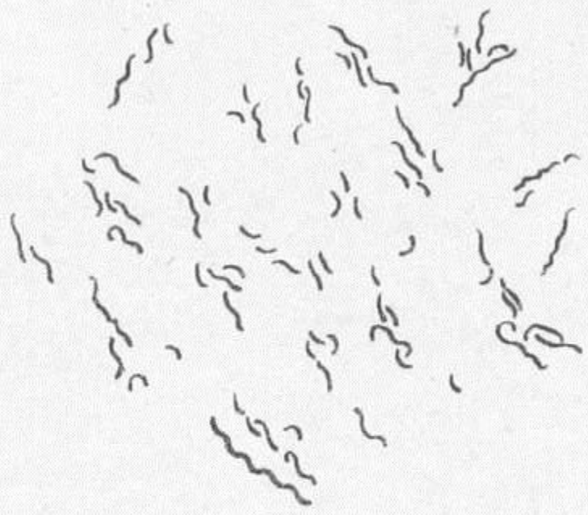


Fig. 3

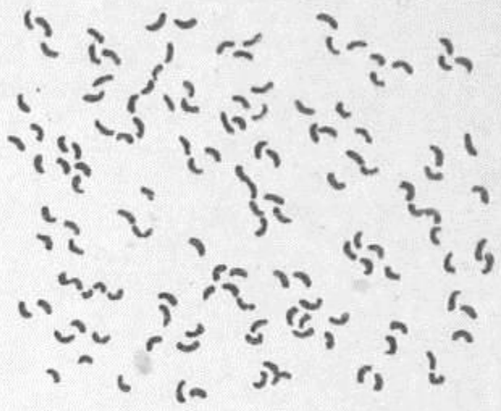


Fig. 4

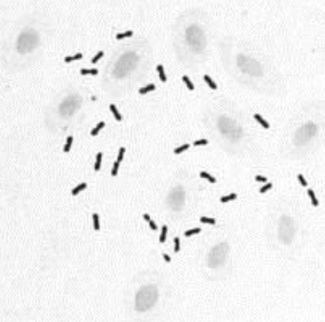


Fig. 5

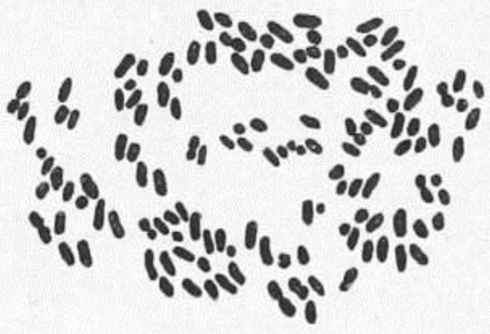


Fig. 6

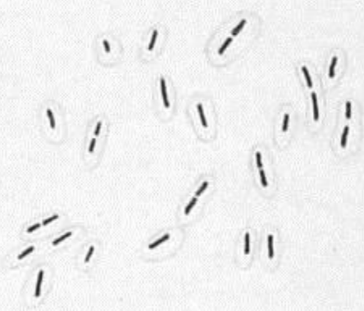


Fig. 7

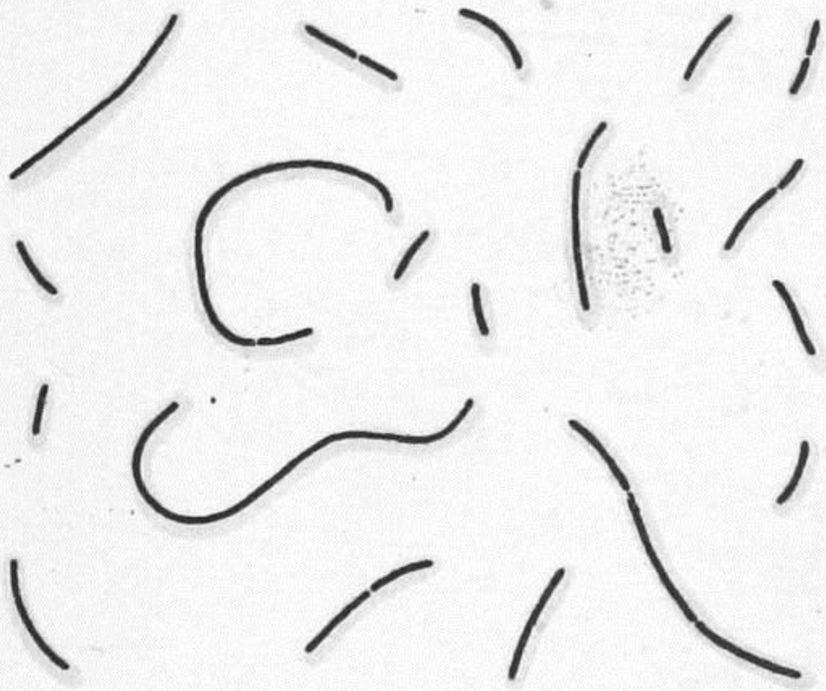


Fig. 8

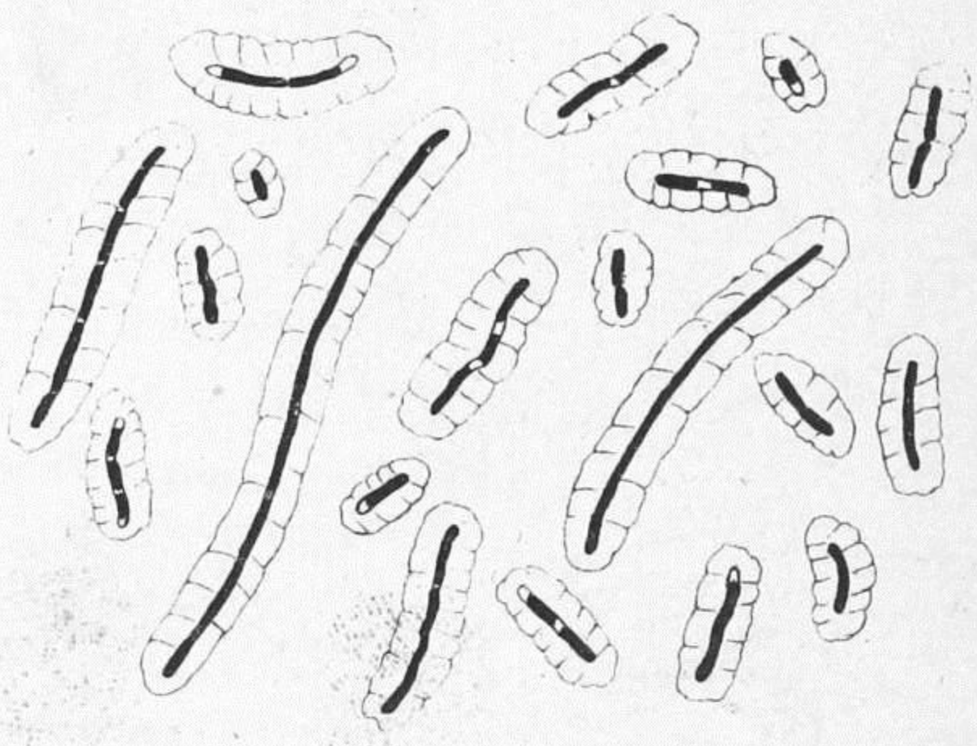


Fig. 9

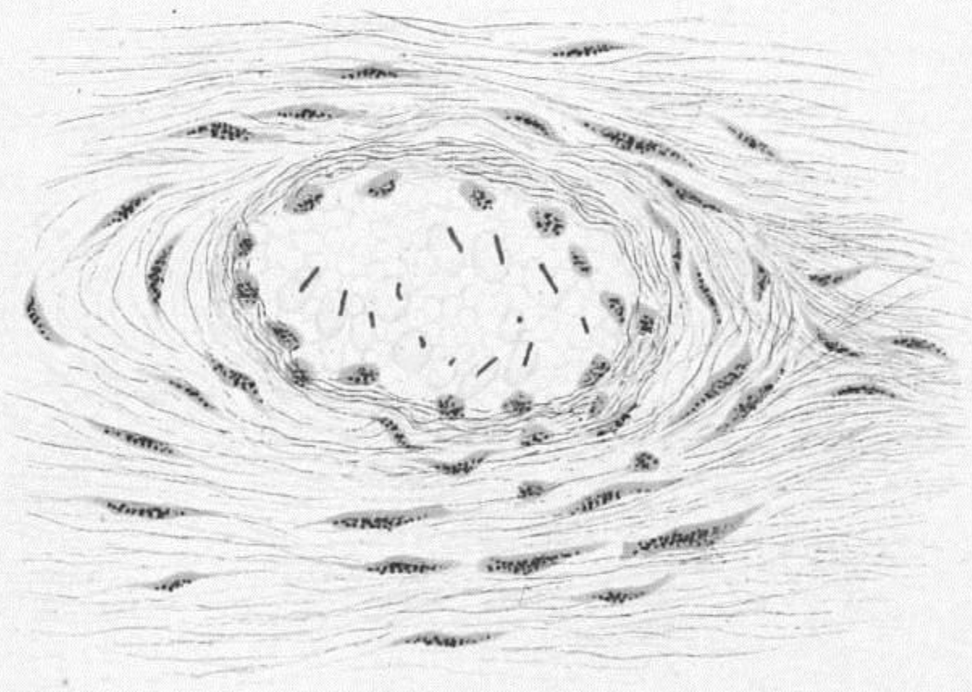
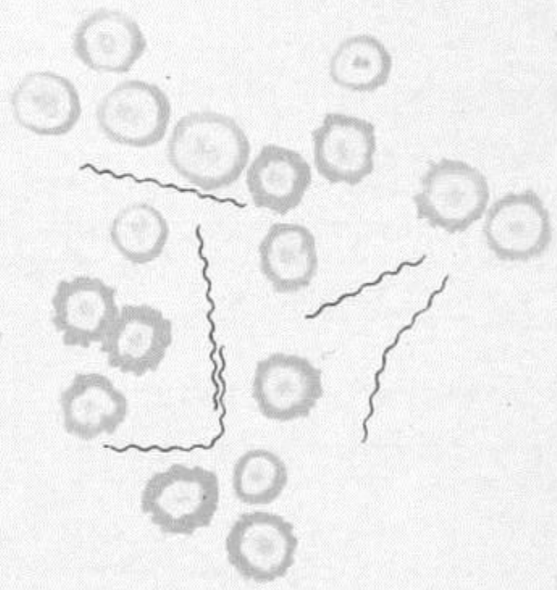


Fig. 10



LIT. SALUSSOLIA, TORINO

Tavola VIII.

Fig.

1. Diplococco lanceolato. Cultura nell'agar. — 950 d.
2. Diplococco lanceolato. Sezione di polmone epatizzato. 750 d.
3. Diplococco lanceolato con capsula nell'essudato meningeo (meningite cerebrespinale). — 950 d.
4. Gonococco di Neisser. Cellule di pus gonorroico. — 1000 d.
5. Streptococco piogeno. Coltura nel brodo. — 750 d.
6. Focolaio di stafilococco piogeno nel miocardio. — 620 d.
7. Filamenti di *aspergillus niger* nel rene di coniglio infetto (glomerulo malpighiano distrutto). — 170 d.
8. *Actinomyces bovis*. Sezione di lingua colorata colla safranina (metodo di Gram). — 620 d.
9. Fungo della tigna favosa. Cultura nell'agar. — 730 d.
10. Fungo della tigna tonsurante. Cultura nell'agar. — 730 d.

Fig. 1

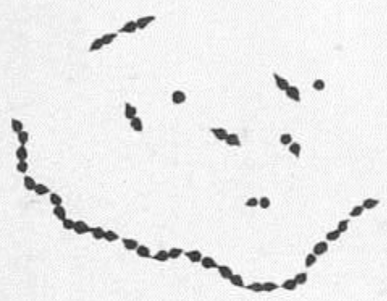


Fig. 2

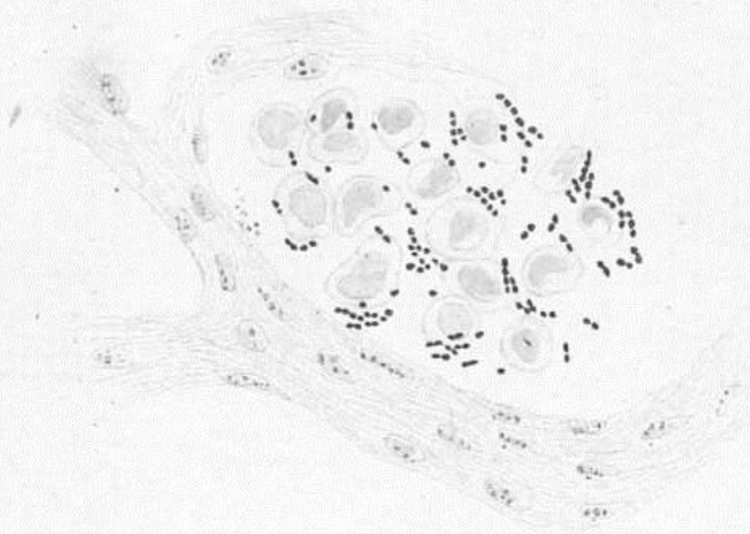


Fig. 3

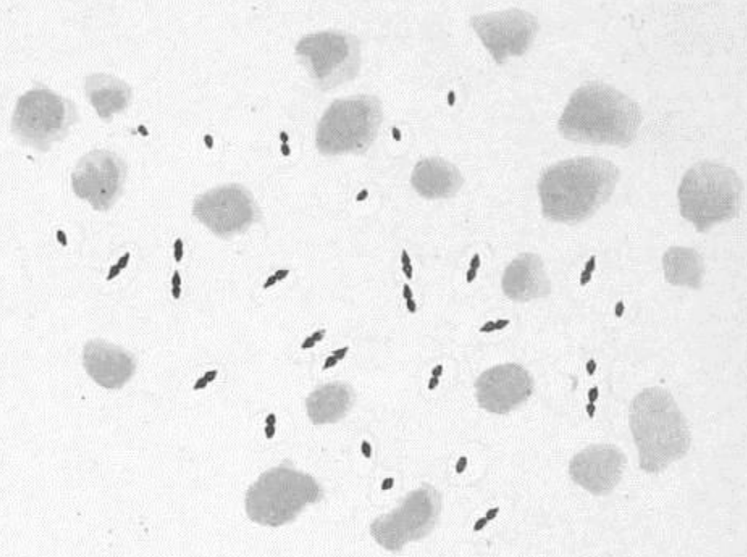


Fig. 4

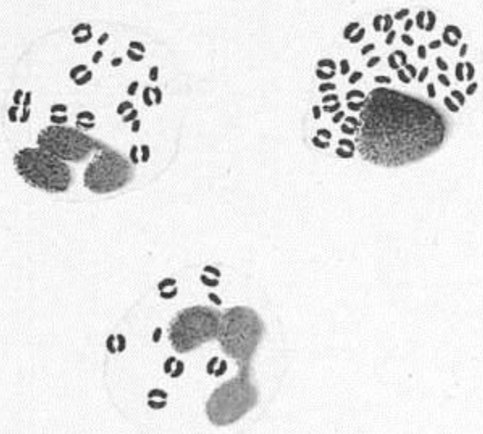


Fig. 5

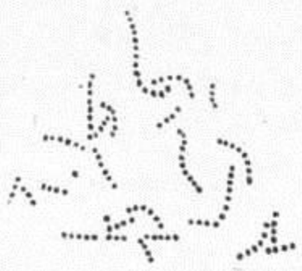


Fig. 6

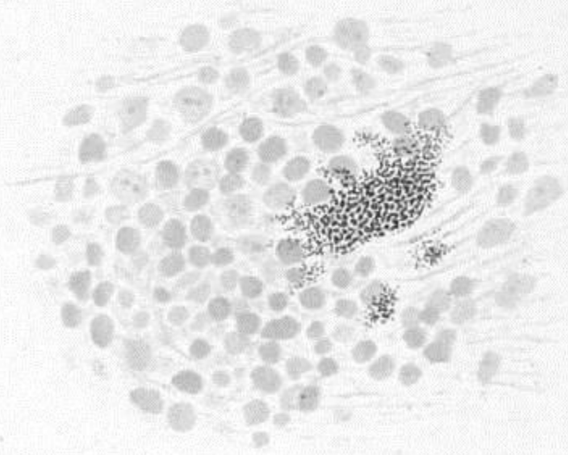


Fig. 7

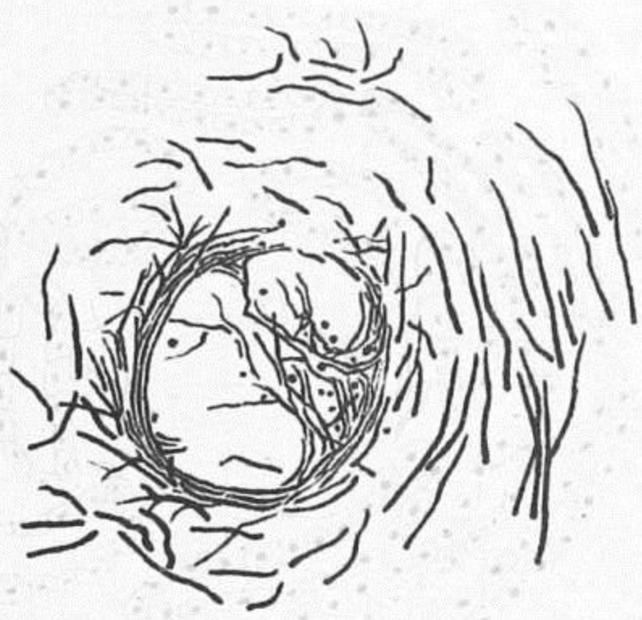


Fig. 8

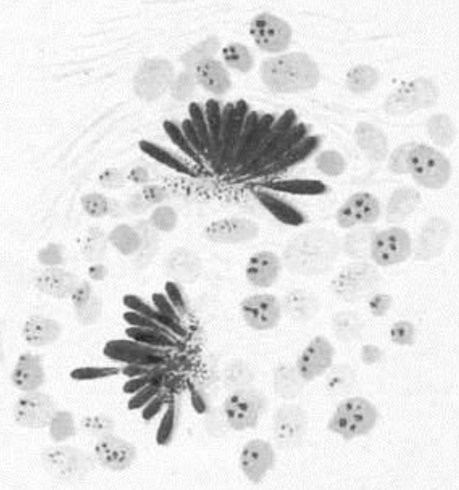


Fig. 9

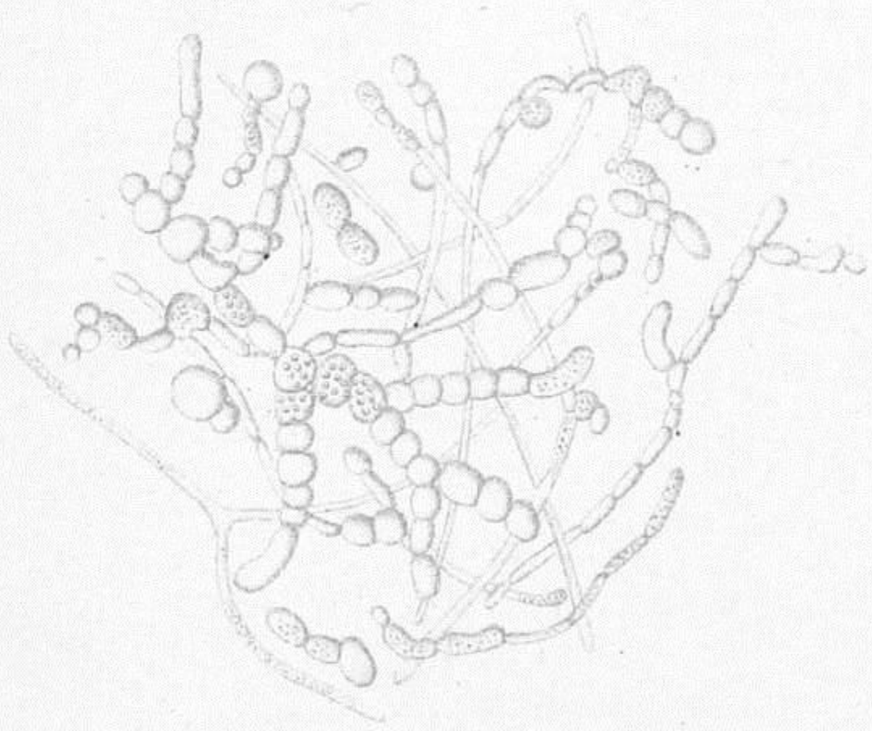
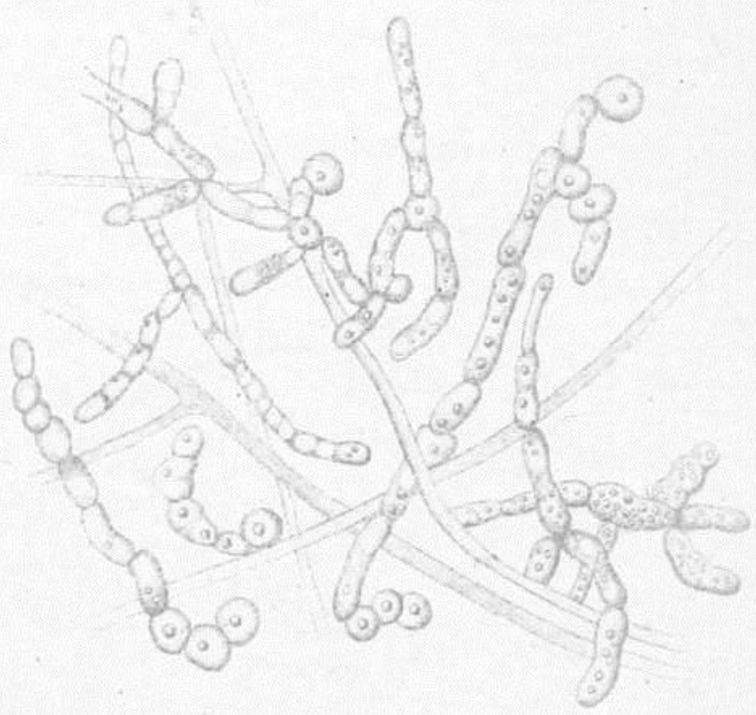
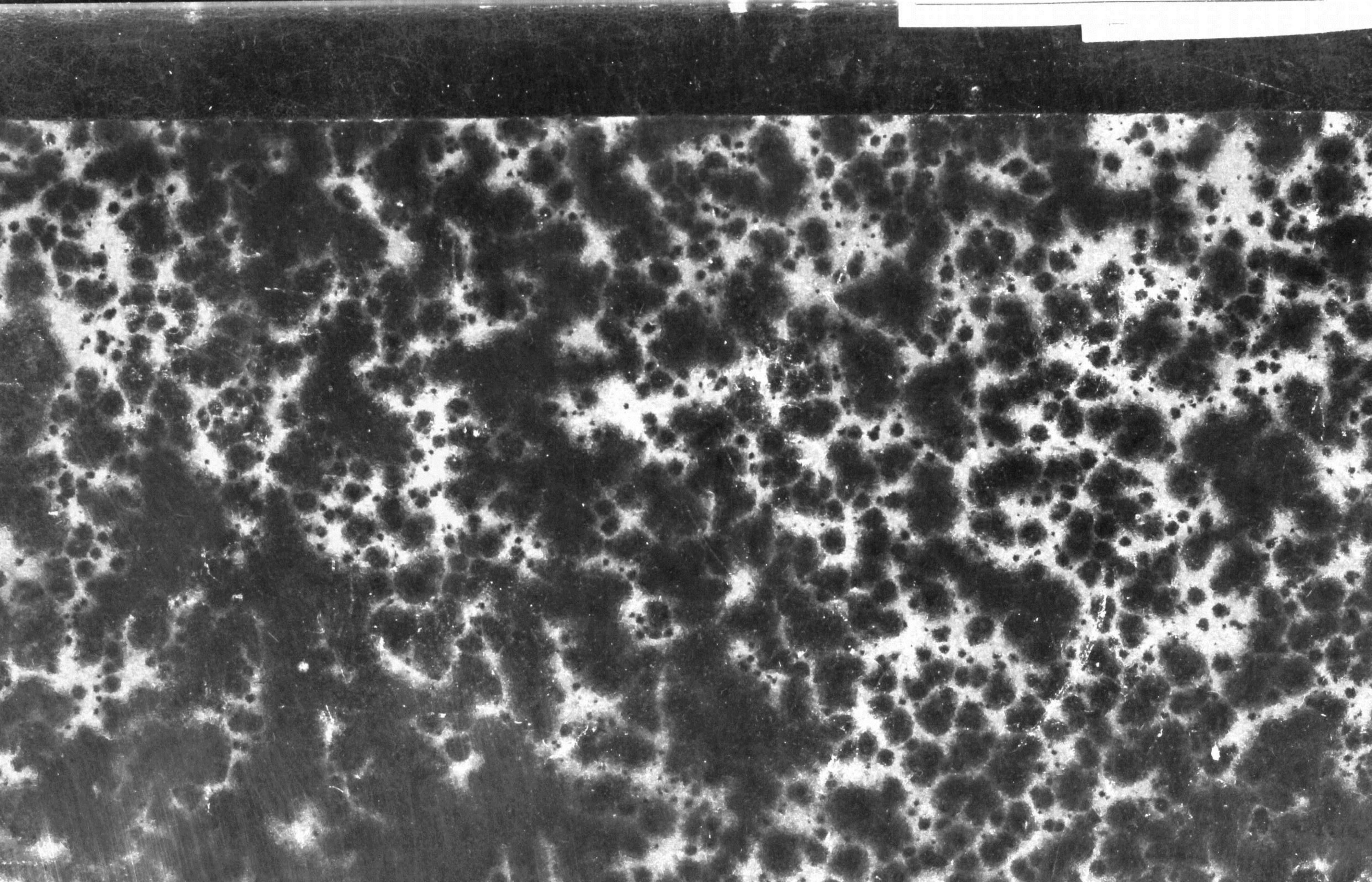


Fig. 10



LIT. SALUSSOLIA, TORINO

~~22~~

1311